

**SPEZIFISCHE METHYLIERUNG VON GENEN IM VERLAUF
DER ZERVIXKARZINOGENESE:
UNTERSUCHUNGEN ZUR KAUSALITÄT**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität**

**von Diplom-Biologin Juliane Hippe, geb. Eiselt
geboren am 07.02.1987 in Weißenfels**

Gutachter

1. Prof. Dr. rer. nat. Matthias Dürst, Universitätsklinikum Jena
2. PD Dr. rer. nat. Roland Schönherr, Lehrstuhl für Biophysik, FSU Jena
3. PD Dr. rer. nat. Andreas Kaufmann, Charité Berlin

Tag der öffentlichen Verteidigung: 1. November 2016

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>i</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>1</i>
<i>Zusammenfassung</i>	<i>4</i>
<i>Summary</i>	<i>5</i>
1 <i>Einleitung</i>	6
1.1 Das Zervixkarzinom	6
1.1.1 Epidemiologie	6
1.1.2 Karzinogenese	8
1.1.3 Diagnose, Therapie und Prävention	9
1.2 Humane Papillomviren	11
1.2.1 Viraler Lebenszyklus und Transformation	11
1.3 Methylierung	13
1.3.1 Biomarker auf Grundlage von Hypermethylierung	14
1.4 Herleitung der Fragestellung und Ziel der Arbeit	16
2 <i>Material</i>	19
2.1 Geräte	19
2.2 Verbrauchsmaterialien	19
2.3 Chemikalien	20
2.4 Lösungen, Medien, Puffer	21
2.5 Enzyme und Antikörper	25
2.6 Kits	25
2.7 Oligonukleotide	26
2.8 Biologisches Material	26
2.8.1 Gewebe und Bakterienkulturen	26
2.8.2 Zelllinien	26
2.9 Software	27
3 <i>Methoden</i>	28

3.1	Arbeiten mit Geweben	28
3.1.1	Mikrodissektion	28
3.1.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	29
3.2	Arbeiten mit adhärent wachsenden eukaryotischen Zelllinien	29
3.2.1	Behandlung der Zelllinien mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin.....	29
3.2.2	Transfektion mit Lipofectamine 2000 und lentiviralen Vektoren	30
3.2.3	Lentivirale Transduktion	31
3.2.4	Kolonieformierungsassay	33
3.2.5	Proliferationsassay	33
3.2.6	Migrations- und Invasionsassay	33
3.3	Arbeiten mit Prokaryoten.....	34
3.3.1	Herstellung kompetenter Zellen	34
3.3.2	Transformation	34
3.3.3	Kultivierung.....	35
3.4	Arbeiten mit DNA	35
3.4.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	35
3.4.2	DNA-Isolation.....	35
3.4.3	Bisulfitkonversion.....	37
3.4.4	MS-quantitative PCR (qMSP)	38
3.4.5	In-vitro-Methylierung – Kontrollen und Standards	39
3.4.6	Umklonierung des cDNA-Klons ZNF671.....	40
3.4.7	Long-Expand-PCR	41
3.4.8	Restriktionsverdau	42
3.4.9	Ligation	43
3.4.10	Plasmid DNA Präparationen	43
3.5	Arbeiten mit RNA	44
3.5.1	RNA-Isolation	44
3.5.2	Reverse Transkriptase-PCR	44
3.5.3	quantitative PCR (qPCR)	45
3.5.4	RNA-RNA in situ Hybridisierung	46
3.6	Arbeiten mit Proteinen.....	48
3.6.1	Probengewinnung	48
3.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	48
3.6.3	Western-Blot.....	50
3.6.4	Immundetektion	51
4	Ergebnisse	52

4.1	Expressions- und Methylierungsanalysen.....	52
4.1.1	Expressions- und Methylierungsanalysen in Zellkulturen.....	52
4.1.2	Expressions- und Methylierungsanalysen in Zervixkarzinomzellkulturen und humanen immortalisierten Keratinocyten (HPKs).....	59
4.1.3	Expressions- und Methylierungsanalysen nach einer Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin.....	61
4.1.4	Expressions- und Methylierungsanalysen an Gesamtgewebeproben.....	63
4.1.5	Expressions- und Methylierungsanalysen an mikrodisektiertem Gewebe	67
4.1.6	Zusammenhang Methylierung und Expression.....	69
4.2	RNA-RNA in situ Hybridisierung von ZNF671	69
4.3	Untersuchung der Transkriptvarianten von ZNF671	72
4.3.1	Theoretische Betrachtung	73
4.3.2	Expressionsuntersuchungen in der Zervix	76
4.4	Umklonierung ZNF671	78
4.5	Lentivirale Transduktion ZNF671	79
4.5.1	Virenbildung der HEK293T-Zellen	80
4.5.2	Transduktion der Zervixkarzinomzelllinien	81
4.5.3	Überprüfung des Proteins ZNF671.....	83
4.6	in vitro Funktionsassays ZNF671.....	83
4.6.1	Kolonieformierungsassay	84
4.6.2	Proliferationsassay	85
4.6.3	Invasions- und Migrationsassay	86
5	Diskussion	89
5.1	Expressions- und Methylierungsuntersuchungen.....	89
5.1.1	Zellkulturproben	89
5.1.2	Gewebeproben	92
5.2	ZNF671	93
5.2.1	Lokalisation.....	93
5.2.2	Funktionsassays	94
5.2.3	Interaktionspartner	95
5.2.4	ZNF671 in anderen Krebsentitäten	99
5.3	Ausblick	101
6	Literaturverzeichnis.....	102

7	Anhang.....	i
7.1	Verwendete Gewebe.....	i
7.1.1	Gesamtschnitte.....	i
7.1.2	Mikrodissektion	ii
7.2	Primersequenzen.....	iii
7.3	Tabellen zur Berechnung der relativen Expression und Methylierung CxCa-Zelllinien	vi
7.4	Tabellen zur Berechnung der relativen Expression und Methylierung der Gesamtgewebeproben.....	x
7.5	Tabellen zur Berechnung der relativen Expression und Methylierung der mikrodisektierten Gewebeproben.....	xiv
7.6	Sequenzierungsergebnisse ZNF671-001 im pCDH-Vektor.....	xviii
7.7	Vektorkarten	xxiii
7.7.1	pCMV-SPORT6.....	xxiii
7.7.2	pCDH	xxiii
7.8	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	xxiv
	Danksagung.....	xxviii
	Ehrenwörtliche Erklärung	xxix

Abkürzungsverzeichnis

5-Aza-CdR	5-Aza-2'-Deoxycytidin
A	Adenin
AB	Acrylamid 4 K Solution
ad.	addiere (auffüllen auf)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
C	Cytosin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CG	Cytosin-Guanin Dinukleotid
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie
CIN3+	alle Stadien ab CIN3 (CIN3, Carcinoma <i>in situ</i> , Zervixkarzinom)
CpG	Cytosin-Guanin Dinukleotid
Ct	Cycle threshold
CxCa	Zervixkarzinom
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E-Gene	frühe Gene im HPV-Lebenszyklus
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	extrazelluläre Signalkinasen
<i>et al.</i>	und andere
FA	Formaldehyd
FB	Funktionsbereich
FCS	Fetales Kälberserum
G	Guanin
GOI	Gene of Interest (Kandidatengen)
HBL	Hybridisierungslösung
HCl	Salzsäure
HDAC	Histon-Deacetylasen
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	Humane Immundefizienz-Viren
HKG	Housekeeping-Gen (Haushaltsgen)
HPV	Humane Papillomviren
HR-HPV	Hochrisiko- (high risk) Humane Papillomviren
HRP	Meerrettichperoxidase
i.d.R.	in der Regel
KCl	Kaliumchlorid
KRAB	Krüppel associated Box
LB-Medium	komplexes Nährmedium (lysogeny broth)

Abkürzungsverzeichnis

L-Gene	späte Gene im HPV-Lebenszyklus
LR-HPV	Niedrigrisiko- (low risk) Humane Papillomviren
MAPK	Mitogen-aktivierte-Protein-Kinasen
MBD	Methyl-CpG-Bindeproteine
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger-RNA
MSP	Methylierungsspezifische Polymerase-Kettenreaktion
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (open reading frames)
ORI	Replikationsursprung
Pap-Test	Papanicolaou-Test
PBS	Dulbecco's Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PPI	Protein-Protein-Interaktionen
PPV	Positiver Vorhersagewert
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qMSP	quantitative methylierungsspezifische PCR
qPCR	quantitative PCR
®	Symbol für Marke
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
RT-PCR	Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SSPE	Saline-Sodium Phosphat-EDTA
STM	Specimen Transport Medium
STRING	Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins
T	Thymin
T _A	Annealingtemperatur
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TE	Tris-EDTA
TNB-Puffer	Blockierungspuffer
TNT-Puffer	Waschpuffer
tRNA	transfer-RNA
vgl.	Vergleiche
VLP	virusähnliche Partikel
z.B.	zum Beispiel

Abkürzungsverzeichnis

Einheiten

bp	Basenpaare	μl	Mikroliter
°C	Grad Celsius	ml	Milliliter
s	Sekunden	l	Liter
min	Minuten	pmol	Pikomol
h	Stunde	nmol	Nanomol
d	Tage	μmol	Mikromol
a	Jahre	μM	mikromolar
ng	Nanogramm	mM	millimolar
μg	Mikrogramm	M	molar
mg	Milligramm	nm	Nanometer
g	Gramm	rpm	Umdrehungen je
Da	Dalton		Minute
kDa	Kilodalton		

Auf eine Ausschreibung aller Gennamen und Zelllinien wurde an dieser Stelle verzichtet. Die verwendeten Bezeichnungen können gegebenenfalls auf der Homepage des National Center for Biotechnology Information (NCBI), bzw. des ATCC abgerufen werden.

Zusammenfassung

Bei einer frühzeitigen Diagnose ist Gebärmutterhalskrebs (CxCa) fast immer heilbar. Leider werden durch das aktuelle Screening-Verfahren – den Pap-Abstrich – die Hälfte aller Krebsvorstufen (CIN2/3) übersehen und nur 20% der Frauen mit einem auffälligen Pap-Befund haben tatsächlich Gebärmutterhalskrebs oder eine Vorstufe. Dies trägt dazu bei, dass die Mortalitätsrate beim Zervixkarzinom seit 2004 in Deutschland stagniert. DNA-Regionen, die während der Zervixkarzinogenese spezifisch hypermethyliert werden, sind von diagnostischem Wert. In Vorarbeiten wurde ein Markersset aus hypermethylierten DNA-Regionen etabliert, welches in einer Studie alle Zervixkarzinompatientinnen sowie 56% der Frauen mit CIN3 identifizierte. Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, welche Auswirkungen die Methylierung dieser Markerregionen auf die Expression der entsprechenden Gene hat um dadurch möglicherweise Gene zu identifizieren, welche das Potential haben als Tumorsuppressorgen in der Zervixkarzinogenese zu agieren.

Expressions- und Methylierungsanalysen wurden in Krebszelllinien unter Standardkulturbedingungen mit und ohne 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Behandlung und in klinischen Proben von verschiedenen Zervixgeweben durchgeführt. Eine lentivirale Transduktion in CxCa-Zelllinien erfolgte für den vielversprechendsten Marker. Anschließend wurde untersucht, welchen Einfluss die wiederhergestellte Expression des Gens auf die Krebszelllinien hat.

Für einige Marker konnte eine negative Korrelation zwischen Methylierung und Genexpression in Zelllinien unter Standardkulturbedingungen mit und ohne 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Behandlung gefunden werden. In den untersuchten Gewebeproben zeigte sich eine signifikante negative Korrelation zwischen Methylierung und Genexpression. ZNF671 zeigte in allen Gruppen die deutlichste Korrelation und ist somit das interessanteste Kandidatengen. Die lentivirale Transduktion erbrachte hohe RNA und Protein-Level für ZNF671. In nachfolgenden Experimenten zeigten ZNF671-transduzierte HeLa und CaSki-Zellen eine geringere Migrations- und Invasionsfähigkeit. Bei ZNF671 könnte es sich um ein Tumorsuppressorgen handeln, das durch Hypermethylierung abgeschaltet wird. Seine verminderte Expression könnte in der Zervixkarzinogenese eine wesentliche Rolle spielen.

Summary

Diagnosed early, cervical cancer (CxCa) can almost always be treated successfully. Unfortunately, the current screening method – the Pap smear – misses half of all precancerous lesions (CIN2/3), and only 20% of the women diagnosed with an abnormal Pap smear have cervical disease. This may contribute to the stagnation of the mortality rate of CxCa as of 2004. DNA regions specifically hypermethylated during cervical carcinogenesis may be of diagnostic value. In former work by Hansel and colleagues, a marker set comprising such hypermethylated DNA regions could identify all cervical carcinoma patients and 56% of patients with precancerous lesions in a clinical setting. The aim of this study was to examine which impact the methylation of marker regions may have on the expression of the corresponding genes and possibly among them to find some that have the potential of a tumor suppressor gene in cervical carcinogenesis.

Expression and methylation analyses in cancer cell lines under standard culture conditions with and without 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and in cervical tissue samples of different disease stages were performed. The most promising marker was functionally analyzed by transduction of cervical cancer cell lines with a lentiviral construct containing the ORF of the gene to investigate how its diminished expression may contribute to carcinogenesis.

For some markers, there is a trend for a negative correlation between methylation and gene expression in cell lines under standard culture conditions with and without 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. In the analyzed tissue samples we found also a significant negative correlation between methylation and gene expression. In all groups, ZNF671 showed the clearest correlation and is therefore the most interesting candidate gene. The lentiviral transduction of ZNF671 yielded high RNA and protein expression. In subsequent experiments, ZNF671-transfected HeLa and CaSki cells showed a lower migration and invasion ability.

ZNF671 seems to act as tumor suppressor gene in cervical carcinogenesis and is in the course of tumorigenesis turned off via hypermethylation.

1 Einleitung

1.1 Das Zervixkarzinom

Gebärmutterhalskrebs oder Zervixkarzinom ist eine bösartige Neoplasie der Cervix uteri. Dem invasiven Zervixkarzinom gehen dysplastische Veränderungen der Zellen im Gebärmutterhals voraus. Diese Dysplasien werden je nach Schweregrad als zervikale intraepitheliale Neoplasien (CIN) 1, 2 bzw. 3 bezeichnet, wobei 1 für eine geringgradige, 2 für eine mäßiggradige und 3 für eine schwergradige Dysplasie steht. Grundsätzlich kann aus jeder zervikalen Dysplasie ein invasives Karzinom entstehen. Alle CIN-Stadien besitzen eine nicht-invasive Pathologie ohne Durchbruch durch die Basalzellschicht. Mit zunehmendem Fortschreiten der Dysplasie sinkt die Wahrscheinlichkeit einer spontanen Remission von 55 % (CIN1) auf 10 % (CIN3) [1]. Das CIN3-Stadium wird daher als obligate Präkanzerose eingestuft, welche sich vom malignen Zervixkarzinom dadurch unterscheidet, dass noch kein invasives Wachstum vorliegt. Es kommt wiederum zum Schichtungs- und Differenzierungsverlust, ergo zum Auflösen der für das zervikale Plattenepithel typischen Differenzierung; zu Polymorphismen und zu einer erhöhten Anzahl von Mitosen. Man kann mikroskopisch Abweichungen von der stereotypen Ordnung der schichtbezogenen Differenzierung des Plattenepithels erkennen.

Beim bösartigen Zervixkarzinom ist die Grenze zum Bindegewebe durchbrochen und die Epitheleinheiten wachsen invasiv. Dieses invasive Wachstum erfolgt kontinuierlich in die Umgebung, wie Vaginalbereiche, Blase und Rektum. Es kann zudem noch zu einer diskontinuierlichen Ausbreitung auf dem Lymphweg kommen, wobei man von Metastasierung spricht. Hat sich dieser Zustand etabliert, verringert sich die 5 Jahres-Überlebensrate um bis zu 60% [2].

1.1.1 Epidemiologie

Das Zervixkarzinom nimmt mit ungefähr 528.000 Neuerkrankungen im Jahr den vierten Rang der häufigsten Krebserkrankungen der Frau weltweit ein [3]. Damit fallen fast 8% aller weiblichen Krebserkrankungen darauf zurück und mehr als die Hälfte der Erkrankungen verlaufen tödlich [4]. Eine Infektion mit Hochrisikotypen des humanen Papillomavirus (hrHPV) (siehe 1.1.3) ist eine notwendige Voraussetzung für die

Einleitung

Entwicklung eines Zervixkarzinoms [5]. Die globale Inzidenz und Mortalität hängt von der Anwesenheit von Screening-Programmen für zervikale Präkanzerosen und Gebärmutterhalskrebs sowie der HPV-Impfung ab. Beides ist in Entwicklungsländern weniger ausgeprägt als in wirtschaftsstarken Nationen. Aufgrund dieser Maßnahmen hat es eine 75%ige Abnahme der Inzidenz und Mortalität von Gebärmutterhalskrebs in den letzten 50 Jahren in den zuletzt genannten Ländern gegeben [6] [7]. Allerdings stagniert die Mortalitätsrate seit 2004, wohingegen andere Krebsentitäten weiterhin zurückgehen [3] (siehe Abbildung 1).

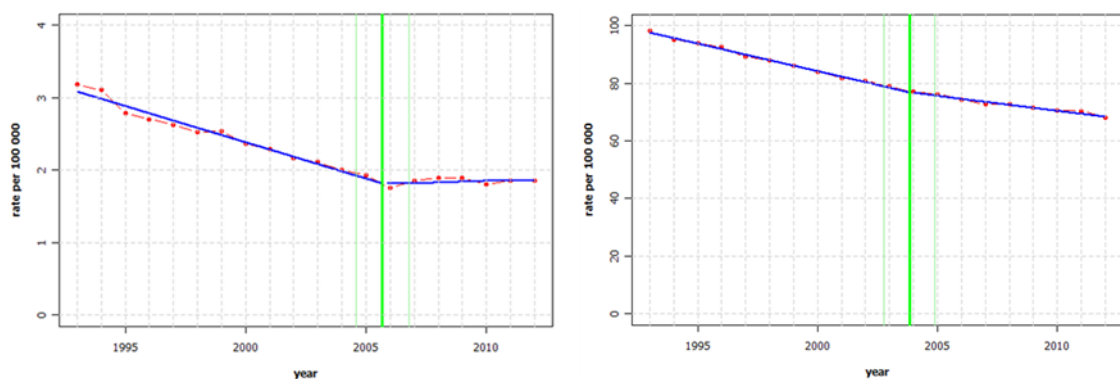


Abbildung 1 – Mortalitätsrate bei Frauen in Deutschland, links: Zervixkarzinom, rechts: alle Krebsentitäten (außer Lunge), GLOBOCAN 2012

Neben dem Hauptrisikofaktor der hrHPV-Infektion gibt es noch andere Umstände und Faktoren, die die Ausbildung eines Zervixkarzinoms begünstigen. Die meisten davon sind assoziiert mit einem erhöhten Risiko für den Erwerb einer solchen Infektion. Dabei wären der frühe Beginn sexueller Aktivität, die Mehrzahl wechselnder Sexualpartner und die Krankheitsgeschichte anderer sexuell übertragbarer Krankheiten zu nennen [8] [9]. Die Einnahme oraler Kontrazeptiva stellt einigen Studien zufolge auch ein erhöhtes Gebärmutterhalskrebsrisiko dar. Eine Analyse von 24 epidemiologischen Studien ergab, dass bei Nutzerinnen oraler Kontrazeptiva das Risiko ein invasives Zervixkarzinom auszubilden, mit der Dauer der Einnahme anstieg [10]. Basierend auf soliden Untersuchungen kann auch postuliert werden, dass Rauchen, sowohl aktiv als auch passiv, mit einem erhöhten Risiko für Gebärmutterhalskrebs bei HPV-infizierten Frauen assoziiert ist [11]. Im Gegensatz zu anderen weiblichen Krebsentitäten, wie dem Ovarialkarzinom, hat eine hohe Parität keinen protektiven Effekt beim Zervixkarzinom [12].

1.1.2 *Karzinogenese*

Die Zervix besteht aus Zylinder- und Plattenepithel, welches die Ektozervix (äußeren, kolposkopisch sichtbaren Teil der Zervix) bedeckt. Der Bereich, an dem beide Epithelarten aufeinandertreffen, wird als Transformationszone bezeichnet. Diese Zone stellt sich als besonders anfällig für eine HPV-Infektion dar. Durch kleinste Hautverletzungen kann HPV in das Gewebe gelangen und die Keratinocyten der Basalzellschicht infizieren [13] (siehe Abbildung 7). Das Virus dringt abhängig vom HPV-Typ über Clathrin- oder Caveolin-vermittelte Endocytose in die Zellen [14] [15]. Die Hülle des Virus wird abgeworfen, das virale Genom gelangt in den Zellkern und wird dort unter Verwendung der Wirtszellmaschinerie repliziert und an Tochterzellen weitergegeben. Anschließend verbleibt in der Basalschicht eine Tochterzelle als Reservoir für die weitere Replikation der viralen DNA, während die anderen Tochterzellen suprabasal wandern. Dabei hemmt HPV den natürlichen Zellzyklusarrest [16]. Im Zusammenhang mit der Zellvermehrung entstehen zervikale, intraepitheliale Neoplasien und im CIN3-Stadium kann es zum Einwachsen in benachbarte Drüsenhöhlräume kommen. Durch das körpereigene Immunsystem kommt es in den frühen CINs häufig dazu, dass die Infektion wieder ausgeheilt wird [17]. Geschieht dies nicht, kann sich über Jahre ein Zervixkarzinom entwickeln (vgl. Abbildung 2). Hierbei ist die Grenze gegen das Bindegewebe durchbrochen und die Epitheleinheiten wachsen invasiv. Es kann zudem noch zu Metastasierungen kommen. In diesem Zustand liegt die standardisierte Mortalitätsrate bei 2,6 pro 100.000 Frauen [Zentrum für Krebsregisterdaten 2011, ICD-10 C53].

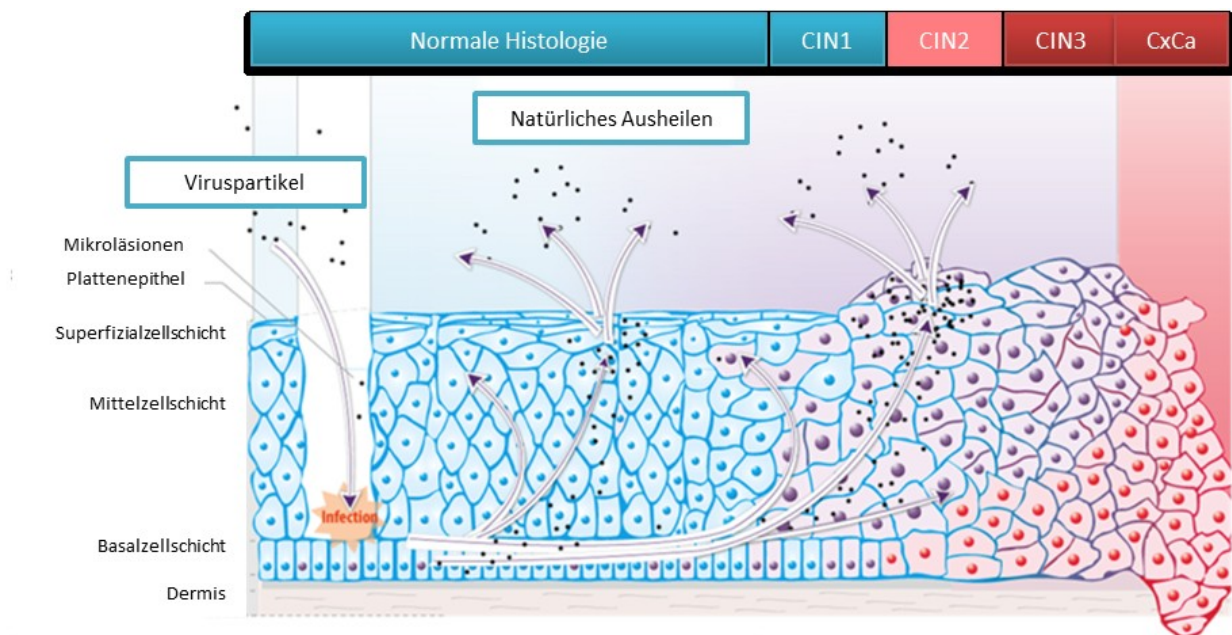


Abbildung 2 – Modell der HPV-vermittelten Zervixkarzinogenese, Viruspartikel dringen über Mikroverletzungen ins Epithel ein und infizieren Basalzellen, virale DNA wird von den Wirtszellen gebildet und an Tochterzellen weitergegeben, welche suprabasal auswandern, über CIN-Vorstufen kann sich ein CxCa entwickeln (modifiziert nach Woodman 2007)

1.1.3 Diagnose, Therapie und Prävention

Um die Krebsinzidenz und –mortalität zu verringern ist eine frühzeitige Diagnosestellung enorm wichtig. Die Heilungschancen des Zervixkarzinoms steigen deutlich, wenn der Krebs in einem möglichst frühen Stadium erkannt wird [18]. Für die Diagnostik von Gebärmutterhalskrebs wird derzeit überwiegend der Papanicolaou-Test (Pap-Test) angewandt. Bei diesem zytologischen Verfahren wird ein Zellabstrich von der Schleimhaut des Gebärmutterhalses genommen und von einem Pathologen auf veränderte Zellen, welche möglicherweise Krebszellen sein könnten, untersucht. Seit Einführung des Pap-Tests in der Krebsvorsorge in Deutschland 1971 sind die Inzidenz des Zervixkarzinoms und die Zahl der Todesfälle durch den Krebs stark zurückgegangen. Nichtsdestotrotz ist dieses Verfahren nicht optimal, da sowohl Inzidenz als auch Mortalität seit circa 20 Jahren nicht weiter sinken [19]. Der Pap-Test ist sehr fehleranfällig, da er enorm von der Qualität des Zellabstrichs und von der Routine und Erfahrung des Zytologen abhängt. Daher hat dieses Screeningverfahren eine geringe Sensitivität, welche bei 50% liegt. Zudem hat das Verfahren einen

Einleitung

geringen Positiven Vorhersagewert (PPV). Nur einer von fünf positiven Befunden entspricht tatsächlich einer Krebsvorstufe [20].

Als therapeutischer Eingriff wird meist eine Konisation vorgenommen. Dabei wird Gewebe in Form eines Kegels (Konus) im Bereich des äußeren Muttermundes (Portio) entnommen. Danach wird der endozervikale Kanal noch zusätzlich mit einem scharfen Löffel (Kürette) ausgeschabt und am Ende des Eingriffes die entstandene Wundfläche elektrisch verschorft. Unerwünschte Spätfolgen und Risiken sind zum Beispiel Früh- oder Fehlgeburten in darauffolgenden Schwangerschaften [21].

In der optimalen Screening-Strategie sollten nur die Vorstufe CIN3 und das Carcinoma in situ (CIN3+), welche höchstwahrscheinlich zu einem invasiven Karzinom führen, erkannt werden (Maximierung der Vorteile des Screenings). Gleichzeitig sollte aber vermieden werden unnötige, nicht zu therapierende transiente HPV-Infektionen und gutartige Läsionen zu detektieren (Minimierung der potenziellen Schäden, die im Zusammenhang mit dem Screening verbunden sind) [22]. Ein besseres Verständnis des Zusammenhangs zwischen HPV und CxCa-Risiko führte dazu, dass es zur Entwicklung von molekularen Tests für HPV kam. Eine detektierbare HPV-Infektion ist aber kein deutlicher Hinweis auf eine bestehende Kanzerose. Der HPV-Test bringt zwar eine Verbesserung hinsichtlich der Sensitivität – in verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass diese vor allem bei hochgradigen CINs deutlich höher ist als beim Pap-Test – er besitzt aber gleichzeitig eine unzureichende Spezifität. Der PPV liegt unter dem des Pap-Tests [20]. Nur jede siebte infizierte Frau weist auch wirklich ein CxCa oder eine CIN3-Vorstufe auf. Ein HPV-Test im primären Screening mit einem zweiten hochspezifischen Triage-Test für alle Frauen mit positivem HPV-Befund stellt eine erstrebenswerte Screeningmethode dar. Einen viel versprechenden Ansatz bilden hierbei Biomarker auf epigenetischer Ebene [23].

Als präventive Maßnahme ist seit 2006 ein Impfstoff gegen das HP-Virus zugelassen. Aktuell sind drei Impfstoffe in Deutschland zugelassen. Der Zweifach-Impfstoff von Cervarix® schützt vor einer Infektion mit den HR-HPV-Typen 16 und 18. Von Gardasil® gibt es seit längerer Zeit einen Impfstoff, der noch zusätzlich gegen die Typen 6 und 11 schützt, welche häufig Genitalwarzen verursachen. Der neue nonavalente Impfstoff von Gardasil® soll nun einer Infektion gegen die HPV-Typen 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, und 58 vorbeugen und wird voraussichtlich ab 2016 in Deutschland auf den Markt

gelangen. Sowohl der Cervarix®- als auch der Gardasil®-Impfstoff besteht aus nicht-infektiösen virusähnlichen Partikeln (VLP). Diese VLPs besitzen die Fähigkeit sich selbst aus 360 L1-Kopien zu assemblieren [24]. Dadurch wird eine Wirksamkeit von 98-100% erreicht [25].

1.2 Humane Papillomviren

Die Ansteckung mit humanen Papillomviren (HPV) ist eine der häufigsten durch sexuelle Kontakte übertragene Infektionen. HPV-DNA kann in 99,7% der Biopsien aus Zervixtumoren nachgewiesen werden [26]. Mit einem Durchmesser von 55 nm handelt es sich bei den humanen Papillomviren, die zur Familie der *Papillomaviridae* gehören, um relativ kleine unbehüllte, doppelsträngige und hoch wirtsspezifische DNA-Viren. Mehr als 150 verschiedene Typen sind aktuell komplett sequenziert wurden [27]. Zwischen 50-80 % aller Frauen infizieren sich im Laufe ihres Lebens mindestens einmal mit genitalem HPV [28]. Durchschnittlich liegt die HPV-Prävalenz zytologisch unauffälliger Frauen bei 11,7 %, mit Peaks in der Altersgruppe unter 25 und über 45 Jahre [29].

Aktuell sind über 150 humane Papillomviren beschrieben, von denen nicht alle ein onkogenes Potential besitzen [27] [30]. Einige sind zum Beispiel für die Entstehung gewöhnlicher verhornender Hautwarzen verantwortlich (kutane HPV), andere infizieren bevorzugt Haut und Schleimhaut im Anogenitalbereich (genitale HPV-Typen mukosaler Art). Diese sexuell übertragbare Gruppe unterteilt sich in Niedrigrisiko- (low risk, LR) und Hochrisiko- (high risk, HR) HPV [27]. Während LR-Viren meist harmlose Warzen oder Condylomata acuminata (Feigwarzen) verursachen, stehen HR-Viren in direktem und eindeutigen Zusammenhang zur Zervixkarzinogenese [31]. Seitdem dies in den 1970er Jahren erstmals von Harald zur Hausen postuliert wurde, ist das Interesse an den Viren ständig gestiegen.

1.2.1 Viraler Lebenszyklus und Transformation

Das HPV-Genom enthält acht Gene mit mehreren Promotoren und somit eine hohe Anzahl an Spleißvarianten, die entweder früh (E) oder spät (L) im HPV-Lebenszyklus exprimiert werden. Die frühen Gene kodieren für Nicht-Strukturproteine, die in der

Einleitung

DNA-Replikation, Transkriptionsregulation, Zelltransformation und Virusaufbau- sowie -freisetzung beteiligt sind. Die späten (L) Gene, L1 und L2 kodieren für virale Kapsidproteine. Ein zusätzlicher 1000 bp großer nichtkodierender Bereich des 8000 bp HPV-Genoms enthält Sequenzen für die Transkriptionsregulation und den viralen Replikationsursprung (englisch Origin of Replication, ORI) [32].

Papillomviren besitzen zwei Formen der Replikation: stabil und vegetativ. Bei der stabilen Replikation der Präkanzerosen liegt das Genom episomal in den Zellen der basalen und parabasalen Epithelschichten vor. Das Kennzeichen einer malignen Transformation mit einem Hochrisiko-HPV-Typen ist die Integration des viralen Genoms in das Wirtszellgenom. Es ist oftmals in Regionen integriert, die als instabil gelten [33].

Die ersten viralen Gene, die exprimiert werden, E6 und E7 sind in der Zelltransformation in HPV Hochrisiko-Typen beteiligt. E6 bildet einen Komplex mit der zellulären Ubiquitin-abhängigen Proteinligase. Dieser Komplex bindet das Tumorsuppressorprotein p53. Es kommt zu dessen Ubiquitinierung und p53-Abbau, wodurch im Falle von DNA-Schäden und zellulärem Stress die anti-proliferativen und pro-apoptotischen Funktionen von p53 vermindert werden [34]. E7 ist ähnlich wie E6 auch ein Onkoprotein. E7 komplexiert mit hypophosphorylierten pRb, wodurch der Transkriptionsfaktor E2F nicht mehr an das Protein pRB binden kann. DNA-Synthese und Zellproliferation sind nun konstitutiv aktiviert [35]. Die Gene E1 und E2 kodieren für DNA-Bindeproteine. E1 ist eine DNA-Helikase/ATPase, die in die virale Replikation eingebunden ist, während E2 einen Transkriptionsfaktor darstellt, der an vier Stellen innerhalb der viralen nichtkodierenden Region bindet. Der Verlust von E2 durch Integration von viraler DNA in das Wirtsgenom stellt die erste Stufe der Transformation dar [36].

In terminal differenzierten infizierten Wirtszellen werden vor allem die späten Gene L1 und L2 exprimiert. Dies geschieht solange, bis die virale Kopienzahl hoch genug ist um Viruspartikel an die Epitheloberfläche abzugeben und andere Zellen zu infizieren [37].

Die meisten HPV-Infektionen sind latente oder asymptomatische Infektionen, die größtenteils unbemerkt vom Körper erfolgreich bekämpft werden. In einigen Fällen zellvermittelter Immunsuppression kommt es jedoch zur Reaktivierung und somit zur potentiellen Karzinogenese.

1.3 Methylierung

DNA-Methylierung ist eine der am intensivsten untersuchten epigenetischen Modifikationen bei Säugetieren. In normalen Zellen sichert es die ordnungsgemäße Regulierung der Genexpression und das stabile Gen-Stilllegen. DNA-Methylierung ist neben der Histon-Modifikation entscheidend für die Genregulation.

Die kovalente Addition einer Methylgruppe erfolgt im Allgemeinen an ein Cytosin in einem CG-Kontext unter Einwirkung der DNA-Methyltransferasen (DNMT) [38], welche wiederum in großen Clustern konzentriert sind – sogenannten CpG-Inseln. Solche CG-Dinukleotide sind im Genom in geringerer Frequenz vertreten, als stochastisch zu erwarten wäre. Im Promotorbereich von Genen sind sie allerdings häufig anzutreffen. Ungefähr die Hälfte der Promotorregionen in den menschlichen Genen enthält diese CpG-Inseln [39]. DNA-Methylierung trifft in den Promoterregionen einer Vielzahl von Orten innerhalb des Genoms auf, wie in den Centromerregionen des Metaphase-Chromosoms, an den Telomerenden, im inaktiven X-Chromosom und in repetitiven Sequenzen [40] [41]. Es ist bekannt, dass die Inaktivierung von bestimmten Tumorsuppressorgenen als Folge der Hypermethylierung in den Promotorregionen vorkommt [42]. Es gibt mittlerweile eine Vielzahl von Studien, die solche Tumorsuppressorgene beschreiben, die durch DNA-Methylierung in verschiedenen Krebsarten stillgelegt werden. Dies betrifft Gene, die in eine Vielzahl von Prozessen eingebunden sind, welche bei der Krebsentstehung eine Rolle spielen, so zum Beispiel in die Regulation des Zellzyklus, DNA-Reparatur, Stoffwechsel von Karzinogenen, Zell-Zell-Wechselwirkungen, Apoptose und Angiogenese [43] [42].

Neben den DNA-Methyltransferasen sind noch weitere Enzyme essentiell für die effektive Hypermethylierung. Dazu gehören die Methyl-CpG-Bindeproteine (MBDs), welche beim Auslesen der Methylierungsinformation eine Rolle spielen und zwischen der Methylierungsinformation und Proteinen zur Histon-Modifikation, so genannten Histon-Deacetylasen (HDACs) vermitteln [44]. Diese Deacetylasen sind somit die Schnittstelle zwischen DNA-Methylierung und transkriptioneller Repression durch Chromatinmodifikation.

1.3.1 Biomarker auf Grundlage von Hypermethylierung

Die Herausforderungen auf dem Gebiet der Biomarker für die Krebsdiagnostik liegen vor allem darin eine möglichst hohe Sensitivität und gleichzeitig Spezifität zu erreichen [45]. Sensitivität wird definiert als der Anteil der tatsächlich Kranken, die im Nachweis ein positives Ergebnis erbrachten, wohingegen Spezifität sich auf den Anteil der Patienten bezieht, der die Krankheit nicht hat und auch negativ für den Biomarker getestet wurde. Der ideale Biomarker würde 100% Sensitivität und 100% Spezifität erreichen. Dies würde bedeuten, dass keine Krebspatienten für den Test negativ wären und gleichzeitig keine Krebs-freien-Patienten einen positiven Befund für den jeweiligen Biomarker erbrächten. In den letzten zwei Jahrzehnten ist der mögliche Nutzen von Methylierungsmarkern als Biomarker in der Krebsdiagnostik untersucht worden und einige potentielle Biomarker wurden beschrieben:

Cyclin abhängiger Kinase Inhibitor P16ink4a

P16ink4a ist ein in den Zellzyklus beteiligtes Tumorsuppressorprotein. Es hemmt die Bildung eines E2F-DB Transkriptionskomplexes und fördert die Bildung des Rb-E2F Repressionskomplexes. Dies resultiert in der Transkriptionsrepression und letztendlich dem Zellzyklusstopp [46]. P16ink4a wurde in zahlreichen Tumorarten einschließlich in 27% Dickdarmtumoren gefunden mit einer Sensitivität von 70% [47]. Mit einer Spezifität von 100% und einer Sensitivität von 73% liegt es in Patientenseren beim Leberkrebs und hypermethyliert vor [48].

O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase, MGMT

MGMT trägt zur Reparatur von DNA-Schäden bei. Die Repression des Gens erhöht DNA-Schäden, was das Risiko für bestimmte Krebserkrankungen steigert. Viele chemoresistenten Tumore weisen eine hohe Expression von MGMT auf. In Hirntumoren ist dokumentiert, dass in ca. 40% der Patienten das Gen epigenetisch reprimiert vorliegt [49]. Eine ähnliche Beobachtung wird in 46% der kolorektalen Tumorproben berichtet [50]. Neben dem diagnostischen Potenzial sagt die Methylierung der MGMT-Promotorregion auch etwas über die Ansprechempfindlichkeit auf Carmustin (Zytostatika) aus, sowie über das Überleben und Fortschreiten der Krankheit [49].

Glutathion S-Transferase Pi 1, GSTP1

GSTP1 beteiligt sich an der Entgiftung Zelle. Es eliminiert exogene Verbindungen durch die Bindung von Glutathion [51]. Zahlreiche Studien berichten von einer veränderten GSTP1-Expression in einigen Krebsentitäten und es wird mit der Resistenz gegen Chemotherapie in Verbindung gebracht [52] [53] [54]. Der Verlust von GSTP1-Expression durch Promotor-Hypermethylierung ist ein wichtiges Ereignis im Prostatakrebs. Hier wurde eine Hypermethylierung in 73% der Fälle gefunden mit einer Spezifität von 100% [55].

Breast Cancer Typ 1 Susceptibility Protein, BRCA1

BRCA1 ist an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt [56]. Die Inaktivierung des BRCA1-Gens durch Promotor-Hypermethylierung beim Brustkrebs tritt in 13% der Fälle auf, aber abhängig vom Krebs-Subtyp, in bis zu 55% der muzinösen und in 67% der medullären Mammakarzinome [57] [58] [59]. Beim Ovarialkarzinom ist der BRCA1-Promotor in 31% der sporadischen Ovarialkarzinome hypermethyliert was zu einem Verlust der Heterozygotität des BRCA1-Locus führt [58].

Wie man an den Untersuchungen sieht, ist DNA-Methylierung oft nicht spezifisch für eine Krebsentität, sondern existiert vielmehr eine graduelle Verteilung von Tumoren mit verschiedenen Methylierungsintensitäten der CpG-Inseln [60]. Daher scheint es schwierig, eine einzelne DNA-Methylierungs-Veränderung als Biomarker für eine bestimmte Krebsentität einzuführen. Eine Kombination von Methylierungsmarkern eignet sich eher um verschiedene Krebsarten zu unterscheiden und auch um den Mangel an Spezifität eines Einzelmarkers zu kompensieren. Die Kombination verschiedener Biomarker führt zu einer verbesserten Spezifität, aber gleichzeitig meist auch zu einer verringerten Sensitivität. Das Interesse an DNA-Methylierungsmarkern in der Krebsdiagnostik ist in jedem Fall sehr groß und die Ansätze vielversprechend [61].

1.4 Herleitung der Fragestellung und Ziel der Arbeit

Durch langjährige Vorarbeiten im Funktionsbereich (FB) Gynäkologische Molekularbiologie wurde ein Markerset etabliert, welches in CIN3 und CxCa häufig hypermethyliert vorliegt. Zur Identifizierung möglicher Markerregionen wurden vergleichende CpG-Insel-Arrayhybridisierungen durchgeführt. Die verwendeten CpG Island Arrays (Agilent) enthielten Hybridisierungssonden für sämtliche ca. 27.000 CpG-Inseln des humanen Genoms. Dabei wurde Abstrich-DNA von CIN3- bzw. CxCa-Patientinnen und von Patientinnen, die allesamt HPV-positiv waren, aber keine Krebsvorstufe aufwiesen vergleichend auf den Arrays hybridisiert. In Folge der Validierung wurden dann 15 verschiedene DNA-Regionen gefunden, die sowohl in den Arrayexperimenten als auch in den anschließenden quantitativen Methylierungsspezifischen PCRs (qMSPs) in Abstrichen stammend aus CIN3 und CxCa eine starke Methylierung aufwiesen, aber unmethyliert vorlagen in Abstrichen von Patientinnen ohne Dysplasie. Diese 15 putativen Markerregionen dienten als Grundlage für die vorliegende Dissertation und sind in nachfolgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 1 – Übersicht über die untersuchten Gene mit Funktion des exprimierten Gens

Gensymbol	Genname	Funktion des Proteins
ASTN1	astrotactin 1	neuronaales Adhäsionsmolekül, erforderlich für von Gliazellen geleitete Migration im sich entwickelnden Gehirn
DLX1	distal-less homeobox 1	Homeobox Transkriptionsfaktor, wichtig für Kontrolle der kraniofazialen Strukturierung und Differenzierung von Neuronen im Vorderhirn
DMRTA2	DMRT-like family A2	Transkriptionsfaktor, geschlechtlich unterschiedlich exprimiert
EDIL3	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3	Integrinligand, vermittelt Angiogenese, spielt in Gefäßwandumbau und -entwicklung eine Rolle
ITGA4	integrin, alpha 4	Molekül der Integrin-alpha-Kette, spielt eine Rolle bei Zelloberflächenhaftung und Signalübertragung
MEF2C	myocyte enhancer factor 2C	MADS box Transkriptionsfaktor
NXPH1	neurexophilin 1	Haftprotein zwischen Dendriten und Axonen
PCDHGB3	protocadherin gamma subfamily B3	involviert in Aufbau und Funktion von Zell-Zell-Kontakten im Gehirn
RXFP3	relaxin/insulin-like family peptide receptor 3	Relaxin-3 Rezeptor, Modulation neuronaler Schaltkreise
SOX17	SRY (sex determining	in der Regulation der embryonalen Entwicklung

	region Y)-box 17	beteiligt
SSTR1	somatostatin receptor 1	Peptidhormon, Regulation diverser neuronaler Funktionen, wie Neurotransmission, Zellproliferation und endokrine Signaltransduktion
TRH	thyrotropin-releasing hormone	involviert in Regulation und Freisetzung von Schilddrüsen-stimulierenden Hormonen
ZNF146	zinc finger protein 146	Zink-Finger-Familie, Transkriptionsfaktor, spielt vermutlich im Pankreaskarzinom eine Rolle
ZNF568	zinc finger protein 568	Zink-Finger-Familie, Transkriptionsfaktor
ZNF671	zinc finger protein 671	Zink-Finger-Familie, Transkriptionsfaktor

Es sollte nun geklärt werden, welchen Einfluss die Methylierung der Markerregionen auf die Expression der jeweiligen Gene hat. Sollte sich für ein oder mehrere Gene tatsächlich zeigen, dass die Methylierung in der untersuchten Region des Genes eine signifikante Auswirkung auf die Genexpression hat, wäre anzunehmen, dass dieses Gen in einem kausalen Zusammenhang mit der Entwicklung eines CxCa steht. Für dieses Gen/diese Gene sollte dann noch geklärt werden, welche Funktion sie in der Zervix aufweisen und wie sie die Zervixkarzinogenese beeinflussen.

In ersten Expressionsstudien wurde zunächst überprüft, ob die veränderte Methylierung der Markerregionen während der Zervixkarzinogenese eine veränderte Genexpression nach sich zieht. Für spätere funktionelle Analysen sowie zur methodischen Etablierung der Genexpressionsstudien auf mRNA- und Proteinebene wurde die Arbeit zunächst mit verschiedenen von Zervixkarzinom-abgeleiteten Zelllinien durchgeführt. Hierbei wurden die Marker-Genregionen auf ihren Methylierungsgrad und ihre Expression untersucht. Aus den Zellen wurde dazu DNA und RNA isoliert. DNA wurde nach der Bisulfitkonvertierung für Methylierungsanalysen mittels MSP eingesetzt. RNA wurde per reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. In anschließenden realtime-PCRs wurde die Genexpression quantifiziert. Anschließend wurde mit DNA und RNA isoliert aus Gesamtschnitten von Gewebeproben von Frauen mit CIN3+ und Normalgewebe ebenso verfahren. In sich anschließenden Auswerteverfahren kristallisierten sich vier DNA-Markergene heraus, die einen starken Zusammenhang zwischen Expression und Methylierung zeigten. Für diese vier Marker wurden aus Gewebeproben verschiedener Erkrankungsstadien und aus gesundem Zervixgewebe mittels eines Mikromanipulators gezielt die Tumor- bzw. Epithelareale herausgeschnitten. Aus diesem Material wurde ebenfalls DNA und RNA isoliert. Somit

Einleitung

erfolgten die Methylierungs- und Expressionsversuche direkt aus einer Probe. Das dazugehörige Gewebe wurde zudem immunhistochemisch gefärbt und ausgewertet. Der interessanteste Marker wurde nun durch andere funktionellen Analysen weiter untersucht und dessen Einfluss auf die Zervixkarzinogenese analysiert. In Abbildung 3 ist schematisch das Vorgehen dargestellt.

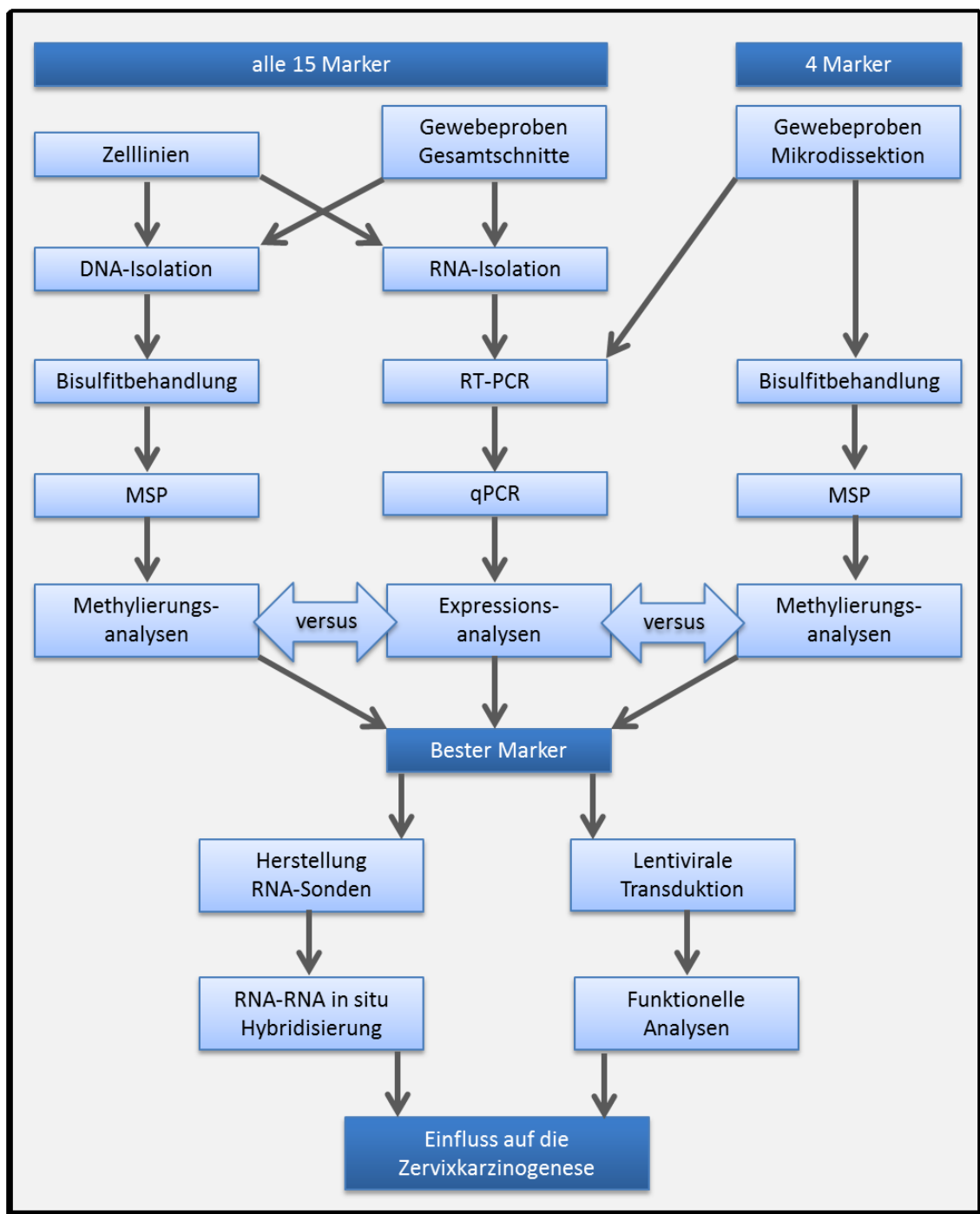


Abbildung 3 – Arbeitsschema

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
ABI 7300 Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Blot-Apparatur Trans-Blot SD Semi-Dry	BioRad
Brutschrank	Heraeus
Cellspin II Zytozentrifuge	Tharmac
Elektrophoresesystem	Biometra
Feinwaage	Satorius
Gefriermikrotom Cryotome®	Shandon
Geldokumentationsanlage DH30/32	Biostep
Invertmikroskop Axiovert 135 mit Mikromanipulator	Zeiss
Mastercycler Gradient, PCR-Gerät	Eppendorf
Megafuge 1.0R	Heraeus
Mikromanipulator	Narishige
Mikroskop Axioplan 2 mit Kamera und AxioVision Software	Zeiss
Mikrotom	Microm
Nadelziehgerät	Narishige
NanoDrop® 1000 Spektrophotometer	Thermo Scientific
pH Messgerät	WTW
RotorGene Q, Real Time PCR-Gerät	Qiagen
Sterilwerkbank	The Baker Company
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge	Eppendorf
Trockenschrank Typ T6060	Heraeus Instruments
UV-Geldokumentationssystem	Biostep
Vakuumverteilerleiste QIAvac 24 Plus	Qiagen

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
0,2; 0,5; 1 und 2ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
15 und 50ml Reaktionsröhrchen	Greiner bio-one
4-er Streifen Reaktionsgefäße (0,1 ml)	Qiagen
8-er Streifen Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Sarstedt
96-Well Platten	Greiner bio-one
Deckgläser 24x50mm; 24x24mm	Menzel-Gläser
Einfriertubes	Greiner Bio-One
Filmkassetten X-OMAT-Kassetten	Kodak
Filterkarten für Cytospins Doppel-Zelltrichter	Tharmac
Filterpapier Whatman 3mm	Schleicher & Schuell

Material

Fixogum Fixieren von Deckgläsern	Marabuwerke
PVDF-Membran 0,45µm Porengröße	Millipore
Röntgenfilme	Thermo Fisher Scientific
Zellkultur 25 und 75cm ² Flaschen	BD Falcon BD Biosciences
Zellkultur 6 und 10cm Schalen	BD Falcon BD Biosciences
Zellkultur 6 und 12 Loch-Platten	BD Falcon BD Biosciences

2.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
5-Aza-2'-Deoxycytidin	Sigma-Aldrich
Agar	Gibco Life Technologies
Agarose	Biozym
Ammoniumpersulfat	Merck
Ampicillin	Sigma-Aldrich
beta-(β-)Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	Merck
Cresylviolet (Farbgehalt mind. 70%)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Gibco Life Technologies
Dulbecco's Phosphate buffered Saline (PBS)	Gibco Life Technologies
Eosin Y	Sigma-Aldrich
EpiLife Medium	Life Technologies
Ethanol 96%ig	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA)	Merck
Formaldehyd	Merck
Formamid	Roth
Gene Ruler 1kb Plus DNA Ladder	Fermentas
GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder	Fermentas
Glycerin	Sigma-Aldrich
Glycin	Merck
Hämatoxylin	Merck
Isopropanol	Merck
Isopropyl-Thio-β-D-Galactopyranosid	PeqLab
Kanamycin	Sigma-Aldrich
LB-Agar	Roth
LB-Medium	Roth
Lipofectamine 2000	Invitrogen Life Technologies
Magnesiumchlorid (25 mM)	Roth
Milchpulver	Roth

Material

N, N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Roth
Natriumhydroxid	Merck
Paraformaldehyd	Roth
Penicillin	Gibco Life Technologies
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Invitrogen Life Technologies
Polybrene	Sigma-Aldrich
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)	Gibco Life Technologies
Saccharose	Merck
S-Adenosylmethionin	New England BioLabs
Salzsäure	Merck
Sodium dodecyl sulfate	Roth
Specimen Transport Medium (STM)	Qiagen
Tris-Base	Roth
Trypsin	Invitrogen Life Technologies
Tween 20	Sigma-Aldrich

2.4 Lösungen, Medien, Puffer

5x Gelladepuffer:	0,25 ml (25 mM)	Tris-HCl (1 M, pH 7,5)
	0,3 ml (150 mM)	EDTA (0,5 M, pH 8,0)
	5 mg (0,05%)	Bromphenolblau
	2,5 ml (25%)	Glycerol (99%)
	ad 10 ml	ddH ₂ O

Ampicillin 100 mg/ml:	1 g	Ampicillin
	ad 10 ml	ddH ₂ O

EDTA 0,5 M pH 8,0:	18,62 g	Na ₂ EDTA
	mit NaOH auf pH 8,0 einstellen	
ad	100 ml	ddH ₂ O

LB-Agar:	25 g	Agar
	1 l	LB-Medium
	autoklavieren	
Zusätze:	100 µg/ml	Ampicillin

Material

LB-Medium:	25 g	LB-Medium
ad	1 l	ddH ₂ O
	mit NaOH auf pH 7,0 einstellen	
	autoklavieren	
Zusätze:	100 µg/ml	Ampicillin
NaOH 5 M:	200 g	NaOH
ad	1 l	ddH ₂ O
TBE-Puffer 10x:	108 g (0,9 M)	Tris
	35 g (0,9 M)	Borsäure
	1 g (40 mM)	EDTA
ad	1 l	ddH ₂ O
TE-Puffer :	1 ml (10 mM)	Tris/HCl pH 8,0 (1 M)
	0,2 ml (1 mM)	EDTA pH 8,0 (0,5 M)
ad	100 ml	ddH ₂ O
Tris/HCl (1 M) pH 8,0:	121 g	Tris
ad	1 l	ddH ₂ O
	mit HCl auf pH 8,0 einstellen	
	autoklavieren	

Zellkultur

Einfriermedium:	60% DMEM
	30% FCS (Fetales Kälberserum)
	10% DMSO
Trypsin/EDTA:	1 x PBS
	0,05 % Trypsin
	2 mM EDTA pH 8,0
	steril filtriert

Material

DNA-Isolation aus Tumorgewebe

Verdaupuffer:	200 µl (100 mM)	NaCl (3 M)
	100 µl (10 mM)	Tris/HCl (pH 8,0) (1 M)
	500 µl (25 mM)	EDTA (pH 8,0) (0,5 M)
	500 µl (0,5%)	SDS
ad	8,7 ml	ddH ₂ O

RNA-RNA *in situ* Hybridisierung

Fixierungslösung:	24 g	PFA in 500 ml ddH ₂ O
	1,5 ml	2 M MgCl ₂
	Lösen, evtl. einige Tropfen 10 N NaOH	
	60 ml	20 x SSPE
ad	600 ml	ddH ₂ O

20 x SSPE:	175,3 g	NaCl (3 M)
	27,6 g	NaH ₂ PO ₄ (230 mM)
	7,4 g	EDTA (20 mM)
	mit 10 N NaOH auf pH 7,4 einstellen	
ad	1 l	ddH ₂ O

20 x SSC:	175 g	NaCl (3 M)
	88 g/l	Natriumcitrat (0,3 M) x2 H ₂ O
	mit 1 M HCl auf pH 7 einstellen	

Hybridisierungslösung:	4,6 ml	50 % deionisiertes Formamid
	1 ml	20x SSPE
	2 ml	10% Dextransulfat in 20% FA
	0,1 ml	1 M Tris-Puffer
	0,2 ml	50x Denhardt
	0,5 ml	10 mg/ml t-RNA
	1 ml	10 mg/ml fish sperm DNA
ad	10 ml, gut mischen	

Material

TNT-Puffer (Waschpuffer):	0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 0,15 M NaCl 0,05 % Tween 20
TNB-Puffer (Blockierungspuffer):	0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 0,15 M NaCl 0,5 % Blocking Reagenz (Perkin Elmer Kit)

Western Blot

Trenngelpuffer:	Tris – 181,71 g/l pH = 8,8	= 1,5 M mit HCl einstellen
Sammelgelpuffer:	Tris – 181,71 g/l pH = 6,8	= 0,5 M mit HCl einstellen
6x reduzierender SDS-Probenpuffer:	7 ml Tris-HCl (0,5 M) 3 ml Glycerin 1 g SDS 0,93 g DTT (600mM) Spatelspitze Bromphenolblau	pH=6,8
10x Laufpuffer	144 g/l Glycin = 2 M 30 g/l Tris = 250 M ad 1 l ddH ₂ O	
1x Laufpuffer	Herstellung aus 10x Laufpuffer + 20% Methanol	
Transferpuffer:	5,8 g/l Tris = 48 mM 2,9 g/l Glycerin = 39 mM 0,37 g/l SDS = 0,037% 150 ml/l Methanol = 15%	

Material

Ponceau-Rot-Färbelösung:	0,5 g Ponceau S	
(wieder verwendbar)	1 ml Essigsäure, rauchend	
	99 ml ddH ₂ O	
10x TBS-tween	Tris – 30 g/l = 248 mM	
	NaCl – 80 g/l = 1,37 M	
	KCl – 2 g/l = 26,8 mM	
	Tween 20 – 2 g/l = 1 %	pH = 7,6

2.5 Enzyme und Antikörper

Enzym	Hersteller
2x Fast Start Universal SYBR Green Master (ROX)	Roche
Anti-ACTB mouse-anti-human	BD Bioscience
Antikörper goat-anti-mouse IgG (Heavy & Light Chain) Antibody (HRP)	Dianova Jackson ImmunoResearch
Anti-ZNF671goat-anti-human (KatalogNr: sc-324717)	Santa Cruz Biotechnology
Antikörper mouse-anti-goat IgG HRP	Rockland
AmpliTaQ Gold	Applied Biosystems
CpGMethyltransferase (M.Sssl)	New England BioLabs
Heringssperma-DNA	Roche
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	New England BioLabs
Proteinase K	Merck
Restriktionsendonukleasen (inkl. zugehörige Puffer)	New England BioLabs
RNase OUT	Invitrogen Life Technologies
SuperScript II/III Reverse Transcriptase	Invitrogen Life Technologies
T4 DNA Ligase	New England BioLabs
ZNF671 cDNA Klon (IMAGE ID 5202908/IRAT42 D12)	Life Sciences

2.6 Kits

Kits	Hersteller
DAB-Substrat-Lösung	Perkin Elmer
DAKO EnVision™+ System, HRP	DAKO
EZ DNA Methylation-Gold™ Kit	Zymo Research
innuPREP DOUBLEpure DNA Kit	Analytik Jena
NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Thermo Fisher Scientific
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel
Luminata Forte Western HRP Substrate	Millipore
Z-Competent E. coli Transformation Kit	Zymo Research

2.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Eurofins bezogen. Alle Primer wurden über eine HPSF-Entsalzung aufgereinigt bestellt und nach Angabe des Herstellers mit destilliertem Wasser gelöst, sodass eine Stammlösung von 100 pmol/μl resultierte. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Die Liste der verwendeten Oligonukleotide mit der entsprechenden Nukleotidsequenz befindet sich im Anhang.

2.8 Biologisches Material

2.8.1 Gewebe und Bakterienkulturen

Die verwendeten Gewebeproben entstammen der Tumorbank der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Jena, sie werden dort bei -80°C aufbewahrt. Die verwendete DNA und RNA stammte sowohl bei den Tumoren, den CINs als auch den Kontrollen von Abstrichen von Patientinnen aus der Dysplasiesprechstunde der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Jena. Das verwendete Biopsiematerial wurde den Patientinnen zu diagnostischen Zwecken (Verdacht auf CIN nach Kolposkopie) oder im Rahmen der operativen Entfernung eines Zervixkarzinoms entnommen. Die Abstrichproben wurden alle anonymisiert und die Namen der Patientinnen mit einer zufälligen Zahlenkombination ersetzt.

Die *Escherichia coli* Bakterien zur Klonierung stammen alle vom XL-1 Blue-Stamm ab, welcher den chromosomalen Genotyp *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* besitzt und von der Firma Stratagene stammt. Die Zellen wurden mit Hilfe des Z-Competent *E.coli* Transformation Kit & Buffer Set (Zymo Research) kompetent gemacht und bei -80°C in 50 μl und 100 μl-Ansätzen gelagert.

2.8.2 Zelllinien

Zelllinie	Passage	Ursprung	HPV-Status	Referenz
C4-1	2+4+1	Zervixkarzinom	18	Auersperg und Hawryluk [62]
A 431	168+4	Haut/Epidermoiskarzinom	neg.	Peppelenbosch <i>et al.</i>
BT-474	6+2	Mammakarzinom	neg.	Lasfargues EY <i>et al.</i> [63]

C33A	12+6+6	Zervixkarzinom	neg.	Auersperg [64]
CaSki	16+17+12+2	Zervixkarzinom	16	Pattillo <i>et al.</i> [65]
HaCat	21+3+5+15+10+8+2	Keratinocyten	neg.	Boukamp <i>et al.</i> [66].
HEK293T		humane embryonale Nierenzellen	neg.	Graham <i>et al.</i> [67]
HeLa	21+7+11+6+1+17	Zervixkarzinom	18	Gey <i>et al.</i> [68]
HOC-7	21+1	Ovarialkarzinom	neg.	Buick <i>et al.</i> [69]
HPK IA	49+16+11+2	Humane immortalisierte Keratinozyten	16	Dürst <i>et al.</i> [70]
HPK II	289+38+11+10+13+2	humane immortalisierte Keratinozyten	16	Dürst <i>et al.</i> [70]
HPKIII	55+12+1	humane immortalisierte Keratinozyten	16	Solinas-Toldo <i>et al.</i> [71]
HPKV	12+3+2+10+1	humane immortalisierte Keratinozyten	18	Dürst <i>et al.</i> [70]
HT1080	12+1+1+1+1+13+3	Bindegewebe/Fibrosarkom	neg.	Rasheed <i>et al.</i>
MCF10A	2+4	Mammakarzinom	neg.	Soule <i>et al.</i> [72]
MCF7	13+2	Mammakarzinom	neg.	Russo <i>et al.</i> [73]
MDA-MB-435S	2+8+1+9+1+1+1	Brust/Melanom	neg.	Ellison <i>et al.</i> [74]
ME180	5+3+8+1+1+1	Zervixkarzinom	68	Sykes <i>et al.</i> [75]
MRI-H186	16+67+1+6	Zervixkarzinom	16	Baldus <i>et al.</i>
OvMz	12+1	Ovarialkarzinom	neg.	Mechtersheimer <i>et al.</i> [76]
SiHa	9+2+1	Zervixkarzinom	16	Friedl <i>et al.</i> [77]
SK-OV-3	3+28	Ovarialkarzinom	neg.	Fogh <i>et al.</i>
SW756	7+16+1+1+2+1	Zervixkarzinom	18	Freedman <i>et al.</i> [78]

2.9 Software

Software	Hersteller
7300 Real Time PCR System SDS Software	Applied Biosystems
Argus X1 Version 4.1.3	Biostep
AxioVision40 V 4.5.0.0.	Zeiss
Methyl Primer Express Software v1.0	Applied Biosystems
Primer Express Software v2.0	Applied Biosystems
Rotor-Gene Q Software	Qiagen

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit Geweben

3.1.1 Mikrodisektion

Um heterogenes Zellgewebe als Probenmaterial zu vermeiden, ist es entscheidend, die reine Zellpopulation neoplastischer Zellen von den umliegenden Zellen (z.B. Stroma, Lymphocyten) zu trennen. Somit erhält man Zellsuspensionen, die weitgehend aus dysplastischen Zellen bestehen. Dies erfolgte durch manuelle Mikrodisektion unter histologischer Kontrolle mittels Mikromanipulators [79]. Hierbei wurde mit einer Glasnadel das Gewebe aus Gefrierschnitten herausgekratzt und in entsprechendes Medium aufgenommen. Gefrierschnitte wurden in einer Stärke von 15 µm hergestellt, kurz antrocknen gelassen und bei -80°C in Alufolie eingepackt gelagert oder direkt verwendet. Von jeder Gewebeprobe wurde Material aus drei bis vier Schnitten jeweils in zwei Reaktionsgefäße überführt. In einem befanden sich 11 µl RNase freies Wasser, was direkt in eine reverse Transkription eingesetzt wurde und im anderen 50 µl STM-Puffer (Qiagen) was wiederum direkt für die Bisulfitbehandlung herangezogen wurde. Die verwendeten Gewebeproben sind in einer Tabelle im Anhang (siehe 7.1.2) dargestellt. Es erfolgte dann jeweils vom ersten und vom letzten Schnitt des Gewebeblockes eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung, siehe 3.1.2) mit deren Hilfe mikroskopisch die Histologie beurteilt wurde.

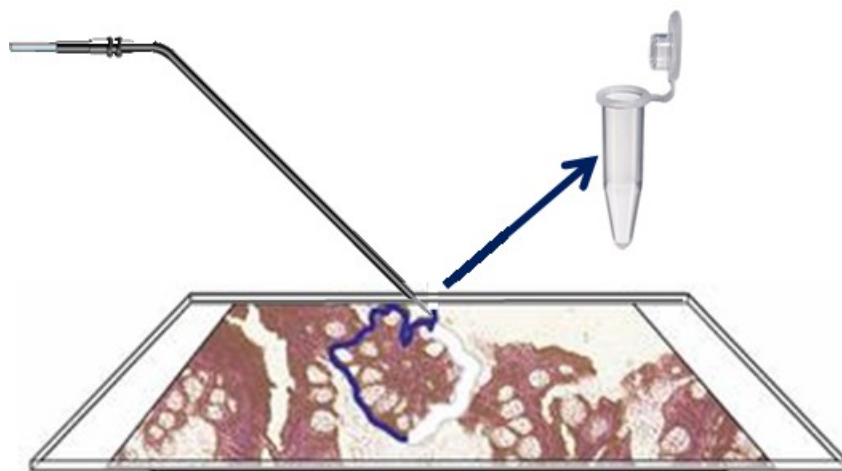


Abbildung 4 – schemat. Darstellung der Mikrodisektion mittels Mikromanipulator

3.1.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Färbung beruht auf dem Auftragen von Hemalum – einem Komplex aus Aluminium-Ionen und oxidiertem Hämatoxylin, was die Zellkerne durch Anlagerung an die negativen Phosphatgruppen der DNA blau anfärbt [80]. Gleichzeitig färbt das Eosin Y die eosinophilen Strukturen wie Zytoplasma oder Mitochondrien rot bis pink.

Für die Färbung werden die Schnitte zunächst in 96%igen Ethanol fixiert und schließlich über eine absteigende Ethanolreihe rehydriert. Im Anschluss erfolgte die zweiminütige Hämatoxolinfärbung, ein bläuen unter Leitungswasser und eine Färbung für zwei Minuten in alkoholischem Eosin. Auf eine aufsteigende Ethanolreihe folgte die Überführung in Xylol zur Entwässerung und Entsprittung der Schnitte bevor es zur Eindeckelung mit Histofluid kam.

3.2 Arbeiten mit adhärent wachsenden eukaryotischen Zelllinien

3.2.1 Behandlung der Zelllinien mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin

5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-CdR) ist ein Pyrimidinnukleosid-Analogon, welches in die DNA integrieren kann und somit die Methylierung durch Bildung eines kovalenten Komplexes mit den DNA-Methyltransferasen blockiert. Es kann folglich die Expression methylierter Tumorsuppressor-Gene reaktivieren und somit ihren anti-tumorigenen Effekt wiederherstellen [81]. Für die der Arbeit zugrunde liegenden Versuche wurden die sechs CxCa Zelllinien CaSki, HeLa, ME 180, MRI H186, SiHa und SW756 mit 5-Aza-CdR behandelt um anschließend DNA und RNA zu isolieren. Zur Kontrolle erfolgte immer auch ein Ansatz mit Wachstum unter Standardbedingungen. Hierfür wurde eine definierte Anzahl von Zellen in einer 10 cm-Wachstumsschale ausgesät, sodass eine 20%ige Konfluenz erreicht wurde. Es erfolgte täglich ein Mediumwechsel, wobei in das Medium der zu behandelnden Gruppe 10 µM 5-Aza-CdR hinzugegeben wurde. Nach fünf Tagen geschah die Zellernte.

3.2.2 Transfektion mit Lipofectamine 2000 und lentiviralen Vektoren

Die Transfektion dient dem Einbringen externer DNA in eukaryotische Zellen mittels Plasmidvektoren. Diese Konstrukte besitzen neben dem einzubringenden Gen auch ein Resistenzgen für eine spätere Antibiotikaselektion erfolgreich transfizierter Zellen. Als Vektoren wurden pCDH, pMDL, pRSV und pVSV-G eingesetzt. Bei pCDH-CMV-MCS-EF1-Puro handelt es sich um einen HIV-basierten cDNA Klonierungslentivektor (System Biosciences, Mountain View, USA). Lentivirale Expressionsvektoren sind die effektivsten Transportsysteme für Transport und stabile Expression von Genen in nahezu alle Säugerzellen [82]. Die anderen drei Plasmide enthalten die für die Herstellung von Lentiviren wichtigen Verpackungsgene.

Zum Test der optimalen Lipofectamine-Konzentration wurden in einem Vorversuch vier verschiedene Verdünnungen mit dem Grün-Fluoreszierenden-Protein (GFP) getestet. Dabei wurde festgestellt, dass 15 µl Lipofectamine die besten Ergebnisse erzielte. Für die Transfektion wurden 1×10^6 Zellen der Virus-produzierenden Zelllinie HEK293T in 6 cm-Schalen am Tag zuvor ausgesät. Für die Transfektion wurde wie im Protokoll des Herstellers beschrieben pro Schale 150 µl Opti-MEM Medium mit 15 µl Lipofectamine 2000 gemischt und zu 150 µl Opti-MEM-Lösung mit den enthaltenen Plasmiden (siehe nachfolgende Tabelle) gegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubation konnte der Transfektionsansatz in das Medium zu den in DMEM kultivierten HEK293T-Zellen gegeben werden und zur optimalen Virusproduktion erfolgte eine Kultivierung der Zellen bei 35°C und 3% CO₂.

Tabelle 2 – für die Produktion der Lentiviren nötige Plasmide

Vektor	Bedeutung	DNA-Menge
pCDH-GOI	lentiviraler Vektor + entsprechende Sequenz des Zielgens	2 µg
pMDL	gag-Gen kodiert für die lentiviralen Fusionsproteine	2 µg
pRSV	pol-Gen kodiert für lentiviralen Proteasen, Reverse Transkriptasen und Integrasen	1 µg
pVSV-g	env-Gen kodiert für die viralen Glykoproteine, Pseudotypisierung	0,4 µg

Nach 48 Stunden erfolgte erstmals eine Ernte des Virusüberstandes (siehe 3.2.3), welche maximal dreifach wiederholt werden konnte.

3.2.3 *Lentivirale Transduktion*

Der in dieser Arbeit verwendete pCDH-Vektor ist ein HIV-1 basiertes Lentivektor-System. 24 Stunden vor Transduktion wurden die Zielzellen in 12-well-Platten ausgesät. Es wurden je well 1×10^4 Zellen ausgesät. Am Tag der Transduktion erreichten die Zellen eine Konfluenz von 10-30%. Nach der Transfektion der HEK293T Zellen mit den lentiviralen Vektoren (siehe 3.2.2) konnten nach 48 Stunden erstmals Viren geerntet werden. Dazu wurde das gesamte Medium abgenommen und in 15 ml-Reaktionsgefäßen gesammelt. Die Überstände der 6 cm-Schalen mit den HEK293T-Zellen, die den gleichen Virus verpackten, wurden vereinigt. Anschließend wurden auf die virusproduzierenden Zellen neues Medium (DMEM) gegeben und weiter kultiviert. Um das virushaltige Medium von mitabgesaugten HEK293T Zellen zu reinigen, wurde es mittels 0,45 µm-Filtern filtriert. Pro Transduktion wurden zwei Infektionszyklen im Abstand von 24 Stunden durchgeführt. Der Virusüberstand konnte viermal geerntet werden. Zwei Überstände wurden bei -80°C eingefroren und konnten für eine erneute Transduktion wieder aufgetaut und weiter verwendet werden. Für den ersten Infektionszyklus wurden zu dem Viruscocktail noch 2 µg/ml Polybrene gegeben. Für die Infektion der Zielzellen musste zunächst das aufgebrachte Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen werden. Nun wurde 1 ml des filtrierten Virusüberstandes darauf gegeben und die Platte in einem verschlossenen Behältnis 45 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach einer sechsstündigen Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurde das virushaltige Medium abgenommen, in Korsolex inaktiviert und auf die Zielzellen wurde frisches DMEM gegeben. Die Kultivierung erfolgt entsprechend den Anforderungen der Zelllinie. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

Methoden

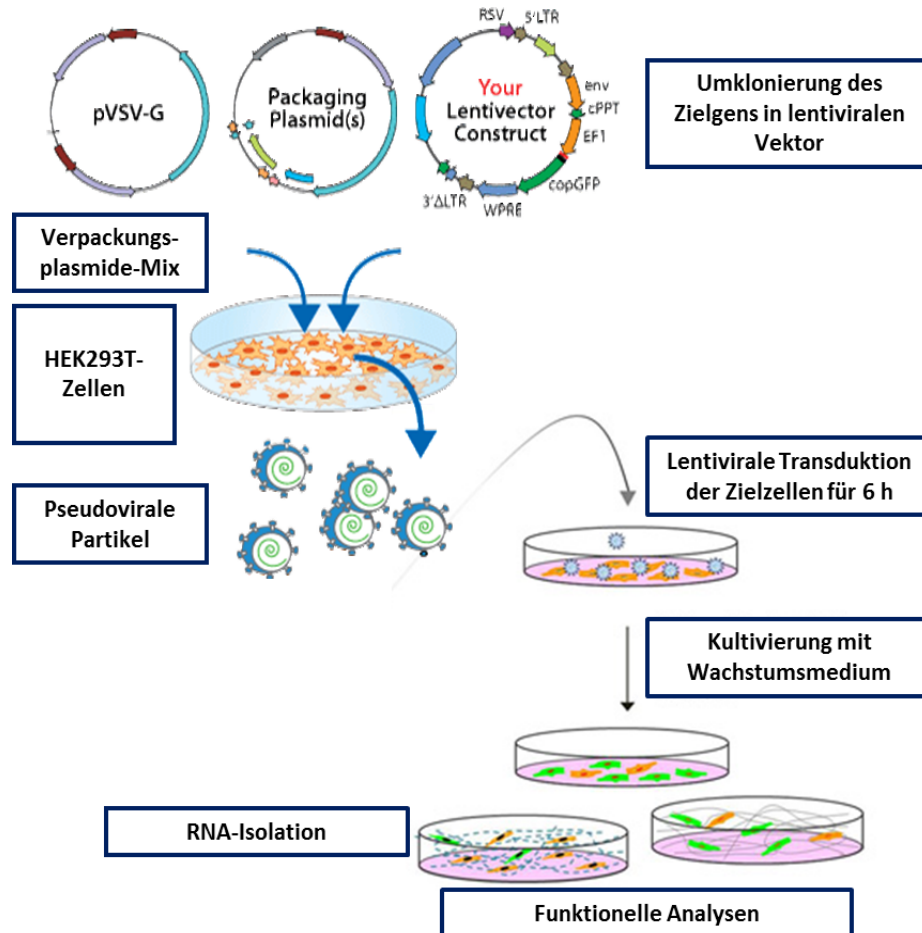


Abbildung 5 – schematische Darstellung der Vorgehensweise zur lentiviralen Transduktion

Nach ausreichender Vermehrung der Zellen konnte RNA isoliert (siehe 3.5.1) und die Expression des in die Zellen eingebrachten Gens untersucht werden (siehe 3.5.2 und 3.5.3). Bei ausreichender Hochexpression wurde jetzt noch zusätzlich eine Selektion auf die erfolgreich transfizierten Zellen durchgeführt. Ein Zytotoxizitätstest zeigte, dass für die verwendeten Zelllinien HeLa und CaSki eine Puromycinkonzentration von 0,5 µg/ml toxisch ist. Durch Zugabe dieser Konzentration ins Medium wurde erreicht, dass nach einer Woche alle Zellen abgestorben sind, die den eingebrachten Vektor, der neben dem Gen von Interesse auch ein Puromycinresistenzgen enthält, nicht besitzen. Mit diesen selektionierten Zellen wurden dann verschiedene *in vitro* Funktionsassays durchgeführt (siehe 3.2.4, 3.2.5, 3.2.6). Basis der funktionellen Zellkulturversuche bildeten immer die mit dem Gen ZNF671 Variante 001 lentiviral transduzierten Zellen, die nur mit Leevektor pCDH transduzierten Zellen, sowie als Kontrolle die Ausgangszelllinien HeLa und CaSki. Jeder funktionelle Assay erfolgte mindestens im Duplexansatz und wurde zweimal wiederholt.

3.2.4 *Kolonieformierungsassay*

Zur Bestimmung der Kontakt-unabhängigen Zellproliferation wurden Kolonieformierungsassays durchgeführt. Durch die stark verringert ausgesäte Zellzahl wird eine Bewertung der Reproduktionsunterschiede zwischen den verschiedenen behandelten Kulturen möglich. Unter Verwendung von 6-well Platten wurden für Zellen, der Zelllinie HeLa entstammend 1×10^3 und für CaSki-Zellen 5×10^3 Zellen ausgesät. Die Aussaat erfolgte immer im Triplikat und die Kolonieformierung stand unter täglicher Beobachtung. Nach 5 Tagen bei HeLa-Zellen und nach 7 Tagen bei CaSki wurden die Zellen mittels 75%igem eiskaltem Ethanol fixiert und mit 1%iger Kristallviolettlösung gefärbt. Anschließend wurden die Kolonien gezählt.

3.2.5 *Proliferationsassay*

Zur Überprüfung des Einflusses von ZNF671 auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen wurde ein 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-basierter Proliferationsassay mit den ZNF671 stabil transfizierten Zellen, den mit dem Levektor transfizierten Zellen und den unveränderten Zervixkarzinomzellen durchgeführt. Hierfür erfolgte die Aussaat einer genau definierten Anzahl an Zellen (HeLa – 10^4 Zellen, CaSki 5×10^4 Zellen) in einer 96-Loch-Platte. Nach drei, 24, 48 und 72 Stunden erfolgte die Visualisierung stoffwechselaktiver lebender Zellen mittels Reduktion eines wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes zu einem violetten Formazan. Nach Mediumwechsel und Zugabe des Farbstoffes inkubierten die Zellen vier Stunden bei 37°C. Der Substratumsatz wurde im Anschluss durch Zugabe einer Solubilisierungslösung gestoppt und anschließend über Nacht bei 4°C gelagert. Die Vermessung der optischen Dichte (OD) erfolgte bei 570 nm. Die metabolische Aktivität nach 24, 48 und 72 Stunden wurde relativ zu dem Wert nach 3 Stunden ausgewertet.

3.2.6 *Migrations- und Invasionsassay*

Zur Bestimmung der Mobilität und Invasivität der mit ZNF671 transfizierten Zellen erfolgte der Einsatz von, in 24-Well-Platten eingehängten, PCF-Membran-Inserts mit 8 µm großen Poren. Zur Testung der Invasivität wurde zusätzlich eine Vorbeschichtung der Inserts mit einer Basalmembranmatrix (Matrigel) vorgenommen. Dazu wurden

Methoden

80 µl des Matrigels im Verhältnis 1:3 in eiskaltem PBS verdünnt, sofort auf die vorgekühlten Inserts gegeben und für eine Stunde bei 37°C aushärten lassen. Nachfolgende Schritte verliefen homolog für beide Funktionstests. Nach Befüllen der unteren Kammer des Transwell-Komplexes mit 500 µl 10% FCS enthaltenden Kulturmedium wurden je 10^5 Zellen in 500 µl 0,1% FCS enthaltenen Kulturmedium aufgenommen und in die innere Kammer gegeben. Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Medium abgesaugt, mit ddH₂O gewaschen und auf Eis mit 75%igen Ethanol für 20 Minuten fixiert. Nach einem erneuten Waschen wurde das Matrigel vorsichtig mit einem sterilen Baumwollstäbchen entfernt und die Inserts mit einer 0,1%igen, in PBS verdünnten Kristallviolettlösung gefärbt. Nach einem erneuten Waschen und Trocknen der Inserts konnten diese mikroskopisch betrachtet und anschließend mit 10%iger Essigsäure entfärbt werden. Die optische Dichte der erhaltenen Lösung kann bei 630 nm vermessen werden.

3.3 Arbeiten mit Prokaryoten

3.3.1 Herstellung kompetenter Zellen

Escherichia coli-Zellen (*E. coli*) von Stamm XL1-blue wurden mithilfe des Z-Competent *E. coli* Transformation Kits (Zymo Research) dem Herstellerprotokoll folgend kompetent gemacht, abschließend in Aliquots von 100 µl in bei -80°C vorgekühlte Reaktionsgefäße abgefüllt und bei -80°C gelagert.

3.3.2 Transformation

Je Transformationsansatz wurden 100 µl Z-kompetenter *E. coli* langsam auf Eis aufgetaut, zu der zu transformierenden DNA (i.d.R. 10 µl Ligationsansatz) gegeben, gemischt und für 30 Minuten auf Eis gestellt. Danach stellt man die Bakterien für zwei Minuten auf 42°C (Hitzeschock), gibt 1 ml LB Medium hinzu und inkubiert für eine Stunde bei 37°C und 200 rpm auf dem Thermoschüttler. Anschließend plattiert man die Bakterien auf einem selektiven Medium (hier LB-Platten mit Ampicillin) aus und inkubiert sie über Nacht bei 37 °C.

Methoden

3.3.3 Kultivierung

Die Flüssigkultivierung der *E. coli* erfolgte in LB-Medium (siehe 0) bei 37 °C. Zu diesem wurde abhängig vom exprimiertem Resistenzgen ein Antibiotikum hinzugegeben – im hier beschriebenen Fall Ampicillin (100 µg/ml) – und eine Selektion durchgeführt. Die Mikroorganismen wurden in diesem Nährmedium inkubiert. Gleichmäßiges Schwenken und nur locker verschlossene Kultivierungsgefäße stellten aerobe Bedingungen sicher unter denen ein optimales Wachstum der *E. coli* stattfindet.

Für die Generierung klonaler Einzelkolonien und deren Quantifizierung war es erforderlich, die Mikroorganismen zu immobilisieren. Als Basis hierfür dienten sterile Petrischalen mit einer 2%igen LB-Agar-Schicht. Ausgehend von einer Zellsuspension wurden zwischen 20 µL und 100 µl Flüssigkeit auf eine vorgewärmte Platte ausgebracht und mit einem abgeflammt Drigalskispatel sorgfältig verteilt. Nach Übernachtinkubation erfolgten die Begutachtung der Platten sowie die Weiterverarbeitung der Bakterienklone.

3.4 Arbeiten mit DNA

3.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Auftrennung von DNA-Fragmenten. Sichtbar gemacht wurden die Moleküle im Gel durch Färbung mit Ethidiumbromid. Für die Versuche dieser Arbeit wurde je nach Fragmentgröße eine andere Gelkonzentration gewählt.

50 – 200 bp	2,0 % Agarosegel
250 – 1000 bp	1,5 % Agarosegel
> 1000 bp	1,0 % Agarosegel

3.4.2 DNA-Isolation

DNA aus Geweben wurde mittels der Standardmethode durch Zugabe von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol isoliert [83]. Bei dieser Methode wird die Phasentrennung durch Zentrifugation genutzt, um die leichtere flüssige Phase von der schwereren organischen Phase zu trennen. Hierzu wird das Gewebematerial zu 500 µl

Methoden

Verdaupuffer (siehe 0) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zugabe von 5 µl Proteinase K wird die Lösung über Nacht (circa 12 h) bei 56°C auf einem Thermomixer inkubiert. Am nächsten Tag gibt man 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zu der Probe und mischt diese gründlich. Dann wird die Probe für zehn Minuten bei Raumtemperatur und 14000 rpm zentrifugiert, die obere wässrige Phase abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1/10 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat und zwei Volumen eiskaltem Ethanol (96%), wird zum Fällern der DNA die Probe für 30 Minuten bei -80°C inkubiert und im Anschluss 20 Minuten bei 4°C unter maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nun wird der Überstand abgenommen und das Pellet mit Ethanol (70%) gewaschen. Es erfolgt abermals ein Zentrifugationsschritt bei 4°C unter maximaler Geschwindigkeit für zehn Minuten. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen, das Pellet getrocknet, und im Anschluss in 20 µl TE-Puffer gelöst. Die DNA-Konzentration wird mittels Nanodrop (Spektrophotometer) vermessen und bei -20°C aufbewahrt.

DNA aus den Zellkulturen wurde mittels Nucleo Spin RNA (Macherey Nagel) isoliert. Dieses Kit ermöglicht eine Isolierung von RNA und DNA aus einer Probe in einem Arbeitsgang. Dabei werden DNA und RNA nacheinander von der Säule mit Puffer mit niedrigem Salzgehalt bzw. Wasser eluiert. Hierbei erfolgte die Isolation laut Herstellerprotokoll.

DNA aus mikrodisektiertem Gewebematerial wurde nicht über eine herkömmliche Isolationsmethode gewonnen, sondern das Material wurde direkt in die Bisulfitkonversion eingesetzt. Dazu wurde das mikrodisektierte Zellmaterial in 50 µl STM-Puffer aufgenommen.

3.4.3 Bisulfitkonversion

Die Methode der Bisulfitkonversion erlaubt einen Nachweis der DNA-Methylierung über PCR. Dazu wird in der zu testenden DNA durch eine chemische Behandlung mit Bisulfit die Methylierung „fixiert“. Bisulfit reagiert nur mit unmethyliertem Cytosin, was dazu führt, dass dies in Uracil konvertiert. Dazu lagert sich das Bisulfit zwischen die 5,6-Doppelbindung des Cytosins an, die Aminogruppe an Position 4 hydrolysiert und bildet ein Uracil-Bisulfit-Addukt, welches sich schließlich zu Uracil umformt. Alle methylierten Cytosine (5-Methylcytosine) bleiben erhalten [84]. In der anschließenden quantitativen methylierungsspezifischen PCR (qMSP) paart Uracil mit Adenin, nicht wie Cytosin mit Guanin (siehe 3.4.4).

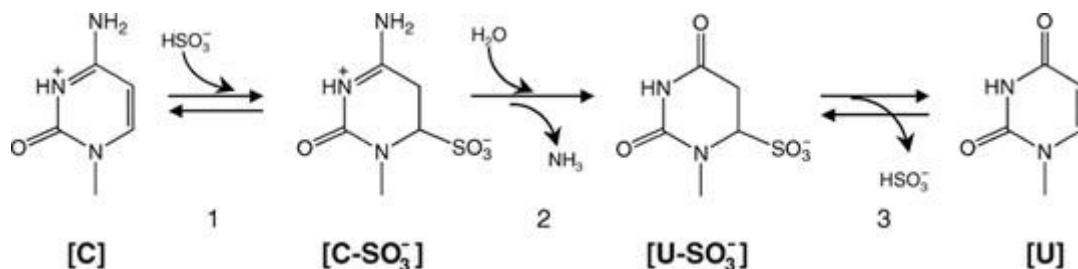


Abbildung 6 – Bisulfitkonversion von Cytosin [C] über Cytosinsulfonat [C-SO₃⁻] und Uracilsulfonat [U-SO₃⁻] zu Uracil [U]

Die Bisulfitkonversion wurde mit Hilfe des EZ DNA Methylation Gold Kits (Zymo Research) durchgeführt. Verändert zum Herstellerprotokoll wurden 600 µl destilliertes Wasser und 300 µl M-Dilution Buffer sowie 50 µl M-Dissolving Buffer zu der CT Konversionsreagenz gegeben. Im Anschluss wurden 100 µl dieses Reagenz zu 50 µl DNA-Probe gegeben und diese Lösung für zehn Minuten bei 98°C und anschließend 150 Minuten bei 64°C inkubiert. Des Weiteren wurde gemäß des EZ DNA Methylation Gold Kits vorgegangen. Anstatt der Zentrifugationsschritte wurde allerdings die Vakuum-Verteilerleiste QIAvac 24 plus von Qiagen eingesetzt. Mit dieser wurde die Lösung durch einen erzeugten Unterdruck aus der Säule gesaugt. Vor der Elution wurde die Säule in einem Sammelgefäß noch kurz bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert, sodass die Säule komplett trocken war. Eluiert wurden mit 20 µl des im Kit enthaltenen Elutionspuffers. Die DNA wurde mit dem Nanodrop (Spektrophotometer) vermessen und bei -20°C gelagert.

Methoden

3.4.4 MS-quantitative PCR (qMSP)

Für die putativen Markerregionen wurden in Vorarbeiten Oligonukleotidprimerpaare entworfen, die eine Unterscheidung von methylierter und unmethylierter DNA nach einer Behandlung mit Bisulfit (siehe 3.4.3) gewährleisten. Diese Primer schließen alle mindestens drei CG-Dinukleotide ein, die nach Bisulfitkonversion von nicht-methylierter DNA verloren gehen und somit auch kein Produkt erzeugen. Die Primersequenzen und zugehörigen Annealingtemperaturen (T_A) sind im Anhang dargestellt (siehe 7.2). Diese methylierungsspezifische PCR wurde als real-time-PCR (MSP) durchgeführt. Hierbei ist eine Auswertung der Amplifikation der Matrize in Echtzeit möglich durch Einsatz eines in die DNA interkalierenden Farbstoffes (SybrGreen), der bei Anregung fluoresziert. MSPs wurden am RotorGene Q als 10 µl-Ansätze nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Tabelle 3 – benötigte Chemikalien und Menge für MSP

PCR-Ansatz Σ 10 µl	
5 µl	Fast Start Universal SYBR Green Master Mix (Roche)
0,25 µl	Primer Mix (5 pmol)
3,75 µl	ddH ₂ O
1 µl (10 ng)	template-DNA

Tabelle 4 – MS-PCR-Protokoll am RotorGene Q

PCR-Protokoll			
Temperatur	Dauer	Phase	Zyklenzahl
95°C	10 min	Aktivierung der Taq-Polymerase	x1
95°C	15 sec	Denaturierung	x40
T_A	20 sec	Primer Annealing	
72°C	30 sec	Elongation	

Das Fluoreszenzsignal wurde in jedem Zyklus in der Elongationsphase gemessen. Nach dem letzten PCR-Zyklus wurde immer eine Schmelzkurvenanalyse vorgenommen. Die Daten wurden mit der RotorGene Q Series Software 1.7 ausgewertet. Der Threshold für die Ct-Bestimmung wurde in die exponentielle Phase der PCR angelegt. Die Semiquantifizierung der Methylierung für das jeweilige *gene of interest* (GOI) erfolgte mittels der ΔC_t -Methode nach folgender Formel.

$$\Delta C_t = C_{t_{GOI}} - C_{t_{HKG}}$$

Methoden

Als Housekeeping-Gen (HKG) wurde für Methylierungsanalysen immer β -Actin (ACTB) verwendet. Für die Berechnung der relativen Methylierung fand anschließend folgende Formel Verwendung.

$$2^{\Delta Ct}$$

Grundlage dieser Formel ist die Annahme, dass ein Zyklus in der PCR – was gleichbedeutend mit einem Cycle Threshold (Ct) ist – einer Verdopplung der Ausgangsmatrize entspricht. Somit kann man auf die Ausgangsmenge der in der PCR vorhandenen DNA schließen.

Nach Ermittlung der relativen Methylierung erfolgte eine Einteilung für das jeweilige Probenset in Proben, die stärker und schwächer methyliert vorliegen.

3.4.5 *In-vitro-Methylierung – Kontrollen und Standards*

Um eine Positivkontrolle für die MSP zu erhalten, wurde DNA mit Hilfe der CpG-Methyltransferase (M.SssI) von New England BioLabs methyliert. Dieses Enzym methyliert alle Cytosinreste (C5) in doppelsträngigen Dinukleotiden mit der Erkennungssequenz 5'...CG...3'. Als Ausgangsmaterial wurde Plazenta-DNA verwendet. Für die Reaktion wurde ein 50 μ l Ansatz nach folgendem Schema gewählt.

50 μ l-Ansatz:	0,25 μ l 200x S-Adenosylmethionin (32mM)
	0,25 μ l CpG Methyltransferase (M.SssI) (4000 U/ml)
	5 μ l 10x NEBuffer 2
	44,5-X μ l ddH ₂ O
	X μ l DNA (\approx 1 μ g)

Die Reaktion wurde in 0,5 ml Reaktionsgefäßen angesetzt und circa 90 Minuten im Brutraum bei 37°C inkubiert. Abschließend erfolgte noch die Bisulfitkonversion bevor die DNA als Positivkontrolle in die PCR eingesetzt werden konnte.

Als Negativkontrolle diente native Keratinozyten DNA, die im eigenen Labor aus Vorhaut gewonnen wird. Kultivierte Keratinozyten sind bewusst gewählt worden, da

Methoden

Karzinome aus dem Deckgewebe der Haut (Epithel) entstehen, welches zu ca. 90% aus Keratinozyten besteht. Außerdem wurde in vorangegangenen Versuchen festgestellt, dass der Großteil des Keratinocyten-Genoms in unmethylierter Form vorliegt. Isolation der Kontroll-DNA erfolgte nach der Phenol-Chloroform-Methode (siehe 3.4.2).

3.4.6 Umklonierung des cDNA-Klons ZNF671

Für die Klonierung des gesamten Lesebereiches des besten Kandidatengens ZNF671 wurde ein cDNA-Klon bei Source Bioscience bestellt (I.M.A.G.E. Fully Sequenced cDNA Clone (potentially full cds) IRATp970D1242D). Dieser musste nun für die Transfektion in den lentiviralen Vektor pCDH umkloniert werden. Dabei ist die Vorgehensweise wie folgt:

- Primerdesign → Forward-Primer mit Startcodon „ATG“ und Kozak-Sequenz
→ Forward- und Reverse-Primer mit jeweils einer Restriktions-
enzymschnittstelle, die im Gen **nicht** vorhanden ist
- Long-Expand-PCR (siehe 3.4.7)
- PCR-Produkte auf Agarosegel auftragen, ausschneiden und eluieren (innuPREP DOUBLEpure)
- Restriktionsverdau mit Restriktionsenzymen, deren Schnittstellen sich in der Primersequenz befinden (siehe 3.4.8)
- Verdau auf Agarosegel auftragen, ausschneiden, eluieren, fällen und vermessen
- Ligation (siehe 3.4.9)
- Transformation (siehe 3.3.2)
- Anzucht der Klone in LB-Medium (siehe 3.3.3)
- Plasmid-DNA-Präparationen (siehe 3.4.10)
- Erneuter Restriktionsverdau zur Kontrolle

Während der Arbeiten ist allerdings aufgefallen, dass der bestellte cDNA-Klon einen Basenpaaraustausch besitzt. Dies führt dazu, dass sich das Leseraster verschiebt und ein Stoppcodon erst an späterer Stelle entsteht. Somit ist das Protein um 22 Aminosäuren länger, als jenes, welches bei NCBI als „Homo sapiens zinc finger protein 671 (ZNF671)“ angegeben wird. Die Sequenz des bestellten cDNA-Klons wird bei NCBI

Methoden

als „Homo sapiens zinc finger protein 671, mRNA (cDNA clone MGC: 4156 IMAGE:5202908“ bezeichnet. Somit ist davon auszugehen, dass der von Life Sciences gelieferte cDNA-Klon kein funktionsfähiges Protein hervor bringt. Um diesen Umstand zu umgehen, wurde ein neuer Reverse-Primer bestellt, dessen Sequenz äquivalent zur tatsächlichen ZNF671-Sequenz ist und das entsprechende Stoppcodon mit einschließt. Zudem enthält er auch die passende Restriktionsenzymchnittstelle. Die Umklonierung erfolgte analog.

3.4.7 Long-Expand-PCR

Die Amplifikation der *Open Reading Frames* (ORFs, offene Leseraster) aus dem ImaGenes Klon für ZNF671 erfolgte mit der Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase und dem zugehörigen 5X Phusion HF Buffer (New England Biolabs). Diese thermostabile Polymerase besitzt neben einer sehr geringen Fehlerrate auch eine 5' → 3' Polymerase- und eine 3' → 5' Exonuklease-Aktivität. Somit lassen sich auch größere DNA-Fragmente effizient amplifizieren. Die extra für die PCR entworfenen Primer müssen neben einer Kozak-Sequenz vor dem ATG-Startcodon auch noch zwei Restriktionsenzymchnittstellen enthalten (hier für *NheI* und *NotI*). Die Primersequenzen sind im Anhang (siehe 7.2) zu finden. Als template-DNA diente die Plasmid-DNA des ImaGenes Klon, bzw. die in den pGEM-T-Vektor umklonierte Plasmid-DNA.

Der PCR-Ansatz in nachfolgender Tabelle wurde zunächst auf Eis zusammen pipettiert und anschließend in einem Thermocycler unter nachfolgenden Bedingungen inkubiert. Nach der Amplifikation wurden die Proben komplett auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, die Bande in der entsprechenden Laufhöhe ausgeschnitten und aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem innuPREP DOUBLEpure Kit (Analytik Jena) nach Herstellerangabe.

Methoden

Tabelle 5 – benötigte Chemikalien und Menge für Long-Expand-PCR

PCR-Ansatz Σ 20 μ l	
4 μ l	5x Phusion HF Buffer (NEB)
2 μ l	Primer Mix (10 pmol/each))
0,4 μ l	dNTP (10 mM)
0,6 μ l	DMSO
0,2 μ l	Phusion High-Fidelity DNA Polymerase
11,8 μ l	ddH ₂ O
1 μ l (100/10/1 ng)	template-DNA

Tabelle 6 – Protokoll für Long-Expand-PCR am Thermocycler (Eppendorf)

PCR-Protokoll			
Temperatur	Dauer	Phase	Zyklenzahl
98°C	30 sec	Aktivierung der Taq-Polymerase	x1
98°C	10 sec	Denaturierung	x15
56°C	1 min	Primer Annealing genspezif. Teil	
72°C	30 sec	Elongation	
98°C	10 sec	Denaturierung	x15
72°C	2 min	Primer Annealing komplett + Elongat.	
98°C	10 min	Finale Elongation	x1

3.4.8 Restriktionsverdau

Zur Analyse von Plasmiden, bzw. zur Generierung von Ligationsschnittstellen für die Klonierung wurde die DNA durch Restriktionsendonukleasen fragmentiert und im Agarosegel aufgetrennt. Verwendet wurden Restriktionsenzyme von New England Biolabs. Für den Verdau wurden die von der Firma empfohlenen Puffer eingesetzt. Bei einem Doppelverdau wurde der Puffer verwendet, der für beide Enzyme optimale Bedingungen liefert und gegebenenfalls wurde die Konzentration des Enzyms erhöht, welches bei dem jeweiligen Puffer nicht die 100%ige Aktivität besitzt. Der Ansatz wurde mindestens drei Stunden bzw. über Nacht bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert. Für die Umklonierung erfolgte sowohl der Doppelverdau für den pCDH-Vektor, als auch für das aufgereinigte PCR-Produkt. In der nachfolgenden Tabelle ist der Restriktionsverdau dafür beispielhaft dargestellt. Die Vektorkarte für den verwendeten pCDH-Vektor inklusive Restriktionsenzymsschnittstellen ist im Anhang (siehe 7.3) dargestellt.

Methoden

Tabelle 7 – benötigte Chemikalien und Menge für Restriktionsverdau

50 µl Ansatz			
pCDH		PCR-Produkt	
8 µl	Vektor pCDH (4 µg)	14 µl	PCR-Produkt
1 µl	NheI	1 µl	NheI
1 µl	NotI	1 µl	NotI
5 µl	CutSmart-Puffer	5 µl	CutSmart-Puffer
35 µl	ddH ₂ O	29 µl	ddH ₂ O

3.4.9 Ligation

Die Ligation dient dazu die zuvor durch Restriktionsverdau generierten Schnittstellen zu verknüpfen. Sie erfolgte mit der T4 DNA Ligase und zugehörigem Puffer von New England Biolabs und es wurde immer ein 10 µl-Ansatz in einem 0,5 ml-Reagiergefäß nach folgendem Schema gewählt.

Tabelle 8 – benötigte Chemikalien und Menge für Ligation

10 µl Ansatz	
1 µl	10x T4 Ligase Buffer
0,5 µl	T4 DNA Ligase
15 ng	15 ng pCDH Vektor verdaut
75 ng	75 ng DNA Insert
ad 10 µl	ddH ₂ O

Der Ansatz wurde über Nacht bei 14°C inkubiert, anschließend erfolgte die Transformation wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben.

3.4.10 Plasmid DNA Präparationen

Nach Transformation wurden Bakterienklone mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agarplatte aufgenommen, in Flüssigmedium überführt und kultiviert (siehe 3.3.3). Von den vermehrten Kulturen wurden Plasmid DNA Präparationen mit dem Nucleo Spin Plasmid Kit (Macherey-Nagel) durchgeführt. Hierzu wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Abschließend wurde zur Kontrolle der Ligation ein Restriktionsverdau vorgenommen. Dazu wurden wieder die beiden Restriktionsenzyme NheI und NotI verwendet.

3.5 Arbeiten mit RNA

3.5.1 RNA-Isolation

Isolation der RNA erfolgte sowohl aus den Gewebeproben, als auch aus Zellkulturmaterial mittels Nucleo Spin RNA Kit (Macherey Nagel). Die Gewebeteile von mikrodisektiertem Material oder die Gesamtschnitte wurden direkt in den aus dem besagten Kit stammenden RA1-Puffer aufgenommen. Als reduzierendes Agens wurde β -Mercaptoethanol immer frisch dem Puffer zugegeben. Aus der laufenden Zellkultur wurden beständig Zellsuspensionen entnommen, bei 1500 rpm fünf Minuten zentrifugiert, sodass ein Zellpellet entsteht und dieses wiederum in PBS gewaschen und in 1,5 ml-Reagiergefäße überführt. Nach erneuter fünfminütiger Zentrifugation bei 1500 rpm wurde das überschüssige PBS entnommen und das gewaschene Zellpellet bei -20°C aufbewahrt um die Zellen zusätzlich aufzuschließen. Zur RNA-Isolation wurde dieses aus dem Tiefkühler entnommen, die entsprechende Menge RA1-Puffer und β -Mercaptoethanol zugegeben und laut Herstellerangaben isoliert. Eine gleichzeitige Isolation der DNA ist mittels des Kits möglich und wurde auch durchgeführt.

RNA aus mikrodisektiertem Gewebematerial wurde nicht über eine herkömmliche Isolationsmethode gewonnen, sondern das Material wurde direkt in die Reverse Transkriptase-PCR eingesetzt. Dazu wurde das mikrodisektierte Zellmaterial in 11 μ l RNase freiem Wasser aufgenommen.

3.5.2 Reverse Transkriptase-PCR

Um die Expressionsrate einer RNA zu bestimmen, wurde eine Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchgeführt. Hierbei wird das Enzym Reverse Transkriptase genutzt um RNA in komplementäre DNA (complementary DNA, cDNA) zu konvertieren und anschließend unter Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase die cDNA amplifiziert [85]. Durch den Gebrauch von Random Hexamer-Primern, die über die gesamte Länge der RNA zufällig binden, erfolgt eine Amplifikation der gesamten RNA-Struktur.

Methoden

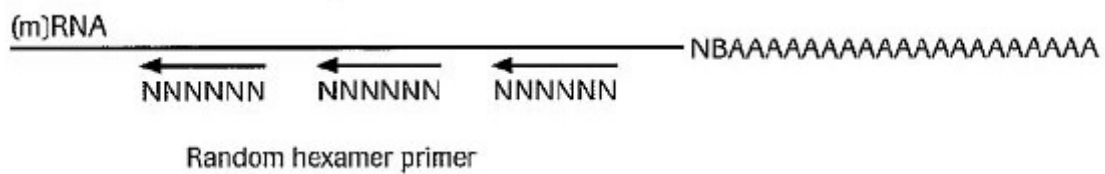


Abbildung 7 – Random Hexamer-Primer binden zufällig über die gesamte Länge der RNA

Es wurden für die unterschiedlichen biologischen Quellen, soweit es möglich war, immer 500 ng RNA eingesetzt und anschließend die Reaktion auf 50 µl eingestellt, sodass sich nach der Transkription rein rechnerisch 10 ng/µl cDNA im Gefäß befinden müssten. Gearbeitet wurde mit dem Enzym SuperScript™ II Reverse Transcriptase von Invitrogen nach dem Herstellerprotokoll. Anders als im Protokoll beschrieben, wurden pro Ansatz nur 100 Units SuperScript™ II RT verwendet.

3.5.3 quantitative PCR (qPCR)

Die quantitative oder auch real-time-PCR (qPCR) wurde zur Bestimmung des Expressionsniveaus der putativen Markergene genutzt. Die genspezifischen Primer für die cDNA-Amplifikation waren immer so entworfen, dass der zu amplifizierende Bereich mindestens zwei Exons abdeckt und soweit es möglich war, sie auf mindestens einem Intron-Exon-Übergang liegen. Die Primersequenzen sind im Anhang (siehe 7.2) zu finden. Die PCR wurde nach folgendem Schema angesetzt und am Abi7300 (Applied Biosystems) durchgeführt.

Tabelle 9 – benötigte Chemikalien und Menge für qPCR

PCR-Ansatz Σ 20 µl	
10 µl	Fast Start Universal SYBR Green Master Mix (Roche)
0,5 µl	Primer Mix (10 pmol)
7,5 µl	ddH ₂ O
2 µl (20 ng)	template-DNA

Methoden

Tabelle 10 – qPCR-Protokoll am Abi7300

PCR-Protokoll			
Temperatur	Dauer	Phase	Zyklenzahl
95°C	10 min	Aktivierung der Taq-Polymerase	x1
95°C	15 sec	Denaturierung	x40
T _A	20 sec	Primer Annealing	
72°C	30 sec	Elongation	

Die Ermittlung der Expression erfolgte ebenfalls über die $2^{\Delta\Delta C_t}$ -Methode (siehe 3.4.4). Je nach Probenset wurde dafür ein anderes Housekeeping-Gen (entweder ACTB oder HPRT) zur Normalisierung verwendet.

3.5.4 RNA-RNA *in situ* Hybridisierung

Vorbereitung

Zur Untersuchung der Gewebe- und Zelltyp-spezifischen Expression des wichtigsten Kandidatengens ZNF671 wurde die Methode der RNA-RNA *in situ* Hybridisierung gewählt. Dafür wurde eine RNA-Sonde komplementär zur spezifischen mRNA von ZNF671 entworfen (siehe 7.2) und somit die Expression direkt an den Normal-, CIN3- und CxCa-Geweben untersucht.

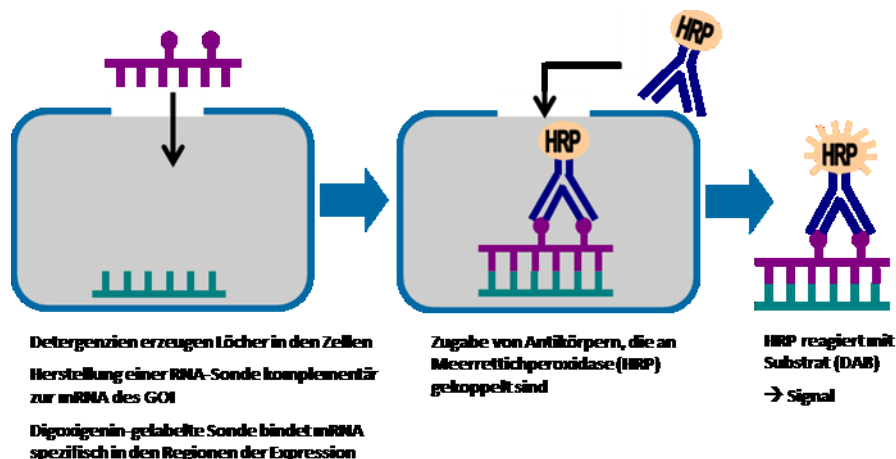


Abbildung 8 – schematische Darstellung der RNA-RNA *in situ* Hybridisierung

Die RNA-Sonde wurde in den Transkriptionsvektor PCR®4-TOPO (life technologies) unter Verwendung des TOPO TA cloning Kits (life technologies) kloniert. Die Sonde wurde mittels des DIG RNA labeling Kits (Roche) mit Digoxigenin markiert und anschließend einer alkalischen Hydrolyse unterzogen. Die Aufreinigung der Dig-

Methoden

markierten Sonde erfolgte über Quick Spin Säulen Sephadex G-50 (Roche) und gefällt wurde mithilfe von total RNA (Roche) und 3 M Natriumacetat und eiskaltem Ethanol (96%). Im Anschluss daran konnte die Sonde in RNase freiem Wasser gelöst werden.

Hybridisierung

Für die Hybridisierung wurden die Kryo-Schnitte auf den Objektträger aufgebracht und in 4%igen Paraformaldehyd, 2x SSPE für 15 Minuten auf Eis fixiert. Danach wurden die Objektträger für 15 Minuten in 70%igen eiskalten Ethanol und für zwei Minuten in 96%igem Ethanol (Raumtemperatur) getaucht. Dann wurden die Objektträger getrocknet. Zum Aufschluss der Zellen erfolgte ein Proteinase K-Verdau (0,5 µg/ml in 2x SSC und 0,1% SDS für fünf Minuten bei 37°C). Die enzymatische Aktivität wurde durch Inkubation in Glycin neutralisiert. Eine zweite Fixierung der Objektträger erfolgte in 4%igen Paraformaldehyd, 2x SSPE für zehn Minuten auf Eis und in 50%igen Formamid, 2x SSPE bei Raumtemperatur für weitere zehn Minuten. Daran anschließend folgte eine Acetylierung mit Essigsäureanhydrid. Die Vorhybridisierung wurde für mindestens drei Stunden bei 42°C in einer Lösung aus 50% Formamid und 2x SSPE durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C in der Hybridisierungslösung. Am nächsten Tag wurden die Schnitte viermal wie folgt gewaschen:

- 50% Formamid, 2X SSPE bei 50°C für 30 Minuten
- 2x SSC, 0,1% SDS für zehn Minuten
- 2x SSC, 0,1% SDS und 10 mg/ml RNase A für 30 Minuten
- 50% Formamid, 0,5% SSC und 0,1% SDS für 30 Minuten

Anschließend kamen die Objektträger in den Waschpuffer, enthaltend 0,1 M Tris-HCl, 0,15 M Natriumchlorid und 0,05% Tween und schlussendlich für 30 Minuten in den Blockierungspuffer, enthaltend 0,1 M Tris-HCl, 0,15 M Natriumchlorid und 0,5% Blockierungsreagens (Perkin Elmer).

Detektion

Die Anti-Digoxigenin-POD-Fab-Fragmente (Roche) wurden 1:50 in den Blockierungspuffer verdünnt und 25 µl dieser Lösung für 30 Minuten in einer feuchten

Methoden

Kammer auf die Objektträger gegeben. Danach wurden die Schnitte in biotinyliertem Tyramid 1:50 in der Amplifikationslösung (TSA) (Perkin Elmer) verdünnt für zehn Minuten inkubiert. Zur Detektion wurde die Meerrettichperoxidase 1:100 in der Blockierungslösung verdünnt und für 30 Minuten auf die Objektträger in der feuchten Kammer gegeben. Die Visualisierung erfolgte mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) (Perkin Elmer) für fünf Minuten. Hiernach wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt und schlussendlich mikroskopisch begutachtet.

3.6 Arbeiten mit Proteinen

3.6.1 Probengewinnung

Aus der laufenden Zellkultur wurden Zellpellets von je mindestens $1-2 \times 10^6$ Zellen hergestellt und bei -20°C eingefroren. Die Lyse der Zellen erfolgte mittels des NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents nach Herstellerangaben. Der Vorteil dieser Methode ist, dass man die Proteine getrennt nach Wirkort gewinnen kann. So erhält man einen Extrakt aus dem Cytoplasma und einen aus dem Zellkern. Für ZNF671 war zu erwarten, dass es als Transkriptionsfaktor vermehrt im Zellkern vorzufinden ist. Das jeweilige Extrakt wurde immer in ein eisgekühltes Reaktionsgefäß überführt. Am Spektrophotometer konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden. Pro SDS-Polyacrylamid-Spur wurden ca. 30 µg Lysat aufgetragen und mit 6x SDS-Probenpuffer versetzt. Das Zelllysate wurde für fünf Minuten bei 99°C gekocht, die Lösung über Nacht eingefroren und am nächsten Tag nach dem Auftauen erneut fünf Minuten bei 99°C inkubiert und anschließend in definierter Menge auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

3.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der Technik der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) kann man komplexe Proteingemische nach unterschiedlichen Größen auftrennen. Je nach Konzentration der Acrylamid-Methylenbisacrylamid-Monomere lassen sich bevorzugt Proteine mit niedrigem (hochprozentigem Gel) oder mit hohem (niedrigprozentigem

Methoden

Gel) Molekulargewicht nachweisen. Für das Protein ZNF671, welches eine Größe von 60 kDa besitzt, eignen sich Gele zwischen 10-15%.

Für ein Trenngel wurden 10 ml nach folgender Tabelle angesetzt. Zur Gewährleistung einer glatten Kante wurden gegossene Trenngele vor der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet.

Trenngel

Tabelle 11 – benötigte Chemikalien und Menge für ein Trenngel (10 ml)

10 ml	AB (30%)	TGP	SDS (20%)	ddH ₂ O	APS (20%)	TEMED
10%	3,33 ml	1,9 ml	50 µl	4,80 ml	40 µl	4 µl
12,5%	4,17 ml	1,9 ml	50 µl	3,93 ml	40 µl	4 µl
15%	5,00 ml	1,9 ml	50 µl	3,10 ml	40 µl	4 µl

AB \triangleq Acrylamid 4K Solution

Zusammensetzung: Acrylamid 4K 292,2 g/l, Bisacrylamid 4K 7,8 g/l

APS \triangleq Ammoniumperoxidsulfat

20%ige Lösung: Feststoff 1 g APS in Röhrchen abwiegen, ad 5 g ddH₂O

Nach erfolgreicher Polymerisation des Trenngels wurde die überstehende Flüssigkeit entfernt und ein kleines, niedrigprozentiges Sammelgel nach folgendem Schema hergestellt.

Sammelgel:

Tabelle 12 – benötigte Chemikalien und Menge für ein oder zwei Sammelgele

5 ml	AB (30%)	SGP	SDS (20%)	ddH ₂ O	APS (20%)	TEMED
4%	0,66 ml	1,25 ml	25 µl	3,10 ml	40 µl	4 µl

Dem Gießen des Gels folgte sofortiges luftblasenfreies Positionieren des Gelkammes bis zur vollständigen Polymerisation.

Beladung des Gels:

Es wurde ausreichend 1x Laufpuffer (siehe 0) in die Kammer gegeben. Als Marker wurde der Thermo Scientific PageRuler Plus Prestained Protein Ladder genutzt. Davon wurden 4 µl aufgetragen. Nach dem Auftragen der Proben wurde das Gel für ca. 15

Methoden

Minuten bei 100 V und anschließend noch eine Stunde bei 180 V laufen gelassen bis die unteren Markerbanden raus gelaufen waren.

3.6.3 *Western-Blot*

Um die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran zu überführen, erfolgte ein Tank-Blot. Sowohl Gel als auch mit Methanol befeuchtete Membran und zugeschnittenes Filterpapier wurden für etwa zehn Minuten in Transferpuffer (siehe 0) äquilibriert und im Anschluss in definierter Reihenfolge (Abbildung 9) zusammen gesetzt.

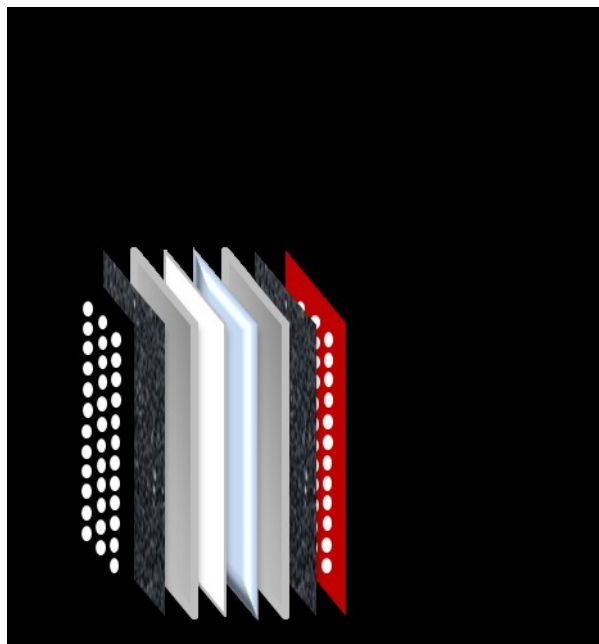


Abbildung 9 – Aufbau des Sandwichs für den Tank-Blot

Der Blot erfolgte für 50 Minuten bei 100 Volt in der Laufkammer. Diese wurde ausreichend gekühlt.

Ponceau-Rot-Färbung:

Nach Ablauf der Blotzeit wurde die Apparatur vorsichtig auseinandergebaut und das Whatman-Papier entfernt. Nach der Entfernung des Gels wurde die Membran zur Kontrolle sofort für fünf Minuten in Ponceau-Rot (siehe 0) überführt, wodurch rote Proteinbanden in den einzelnen Slots sichtbar wurden. Anschließend wurde das Gel langsam in ddH₂O und TBS-tween gewaschen, bis die Farbe komplett wieder verschwunden war.

3.6.4 Immundetektion

Zur Vermeidung eines unspezifischen Hintergrunds auf der Membran erfolgte die Blockierung freier Proteinbindungsstellen mit 1x TBS-tween, welches frisch aus der zehnfach konzentrierten Stammlösung (siehe 0) hergestellt wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur. Selbiges Blockierungsreagens wurde auch zum Verdünnen sowohl des primären als auch des sekundären Antikörpers verwendet. Der Nachweis der ZNF671-Expression erfolgte mittels des Antikörpers von Santa Cruz Biotechnology 1:500 verdünnt über Nacht bei 4°C unter ständigem Schütteln. Aufgrund der unterschiedlichen Proteingröße von ZNF671 (60 kDa) und ACTB (40 kDa) wurde die Membran zerschnitten und der gleichzeitige Nachweis von ACTB mit dem Antikörper von BD Bioscience 1:5000 verdünnt erfolgte ebenfalls über Nacht. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal mit TBS-tween für jeweils zehn Minuten gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem in TBS-tween verdünnten, an eine Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur. Je nach Primär-Antikörper wurden dazu folgende Sekundär-Antikörper verwendet:

ZNF671 – Hase-anti-Ziege (siehe 2.5), Verdünnung 1:5000

ACTB – Ziege-anti-Maus (siehe 2.5), Verdünnung 1:10000

Im Anschluss daran wurde die Membran abermals dreimal mit TBS-tween für jeweils zehn Minuten gewaschen. Die Detektion gebundener Meerrettichperoxidase erfolgte mittels Chemilumineszenz und Röntgenfilmen.

4 Ergebnisse

4.1 Expressions- und Methylierungsanalysen

Der erste Schritt dieser Arbeit bestand zunächst darin den Zusammenhang zwischen Methylierung und Expression in allen 15 putativen Markerregionen, die in Vorarbeiten im Labor Gynäkologische Molekularbiologie gefunden und validiert wurden, zu untersuchen.

4.1.1 Expressions- und Methylierungsanalysen in Zellkulturen

Für die ersten Expressions- und Methylierungsuntersuchungen wurde zunächst auf DNA aus Zellkulturen zurückgegriffen. Nach Durchführung der Methylierungsspezifischen PCRs wurde aus den erhaltenen Ct-Werten die relative Methylierung berechnet (siehe 3.4.4). Daraufhin erfolgte eine Einteilung der verschiedenen Zellentitäten auf Grundlage des Methylierungsstatus. Es wurden dazu die beiden Gruppen „methyliert“ und „unmethyliert“ gebildet. Hierbei wurde der Threshold wie folgt festgelegt:

- $2^{\Delta Ct} > 0,5 \triangleq$ methyliert
- $2^{\Delta Ct} < 0,5 \triangleq$ unmethyliert

Die Entscheidung darüber wurde auf Grundlage einer möglichst homogenen Verteilung der Stichprobengröße in den beiden Gruppen getroffen. Dies ist nötig um eine erfolgreiche Signifikanzberechnung vornehmen zu können. Für das Gen PCDHGB3 musste daher eine Ausnahme eingeführt werden, da für dieses keine Zelllinie einen $2^{\Delta Ct}$ -Wert von $> 0,5$ erbrachte. Es wurde hier der Threshold auf $2^{\Delta Ct} > 0,1 \triangleq$ methyliert und *vice versa* gesetzt. Die Gruppenbildung war für die Auswertung besonders wichtig, da es in erster Linie nicht darum ging eine exakte Methylierungsaussage der Zelllinie für das jeweilige Gen zu treffen, sondern vielmehr zu schauen ob eine stärkere Methylierung mit einer sinkenden Expression einhergeht und umgekehrt.

Die Auswertung der relativen Expression erfolgte nach derselben $2^{\Delta Ct}$ -Methode (siehe 3.5.3 und 7.3). Als Housekeeping-Gen wurde bei diesem Probenet HPRT verwendet, da es höhere Ct-Werte hervorbringt, als ACTB und somit auf einem ähnlichen

Ergebnisse

Expressionslevel liegt, wie die zu untersuchenden Gene. Im Anschluss wurde die relative Expression der beiden gebildeten Gruppen „methyliert“ und „unmethyliert“ gegeneinander in Form von Box-Plots verglichen und Signifikanz mit Hilfe des Mann-Whintey U Tests ermittelt. Es zeigte sich für elf Markerregionen (73,3%) ein Trend zur Herabregulierung, für einen Marker (6,67%) blieb die Expression gleich in beiden Gruppen und für drei Genregionen (20%) war die Expression leicht erhöht in der Gruppe „methyliert“. Für diese Analysen wurden alle unter 2.8.2 aufgeführten Zelllinien verwendet. Die Ovarialkarzinomzelllinie SK-OV-03 wurde nur für das Gen ZNF671 untersucht, da sie später erst zu dem Zellkulturset hinzukam, aufgrund der Empfehlung der Firma Santa Cruz Biotechnology als Positivkontrolle für das Gen ZNF671 im Western Blot. Die Ergebnisse für jedes Gen in Bezug auf die methylierten Zelllinien sind in nachfolgender Tabelle dargestellt. Signifikanz ist mit „*“ in der Tabelle 13 gekennzeichnet.

Tabelle 13 – Ergebnisse Expressionsuntersuchungen in Bezug auf die methylierten Zelllinien

erniedrigtes Expressionslevel	gleiches Expressionslevel	erhöhtes Expressionslevel
ASTN1	TRH	DMRTA2
DLX1 *		PCDHGB3
EDIL3 *		SSTR1
ITGA4		
MEF2C		
NXPH1 *		
RXFP3		
SOX17		
ZNF146		
ZNF568		
ZNF671 *		

Für die Marker DLX1, EDIL3, NXPH1 und ZNF671 ist ein signifikanter Unterschied im Expressionslevel zwischen den methylierten und unmethylierten Zelllinien zu verzeichnen. Signifikanz wurde nach dem Mann-Whintey U Test festgestellt. Für alle anderen untersuchten Gene war der jeweilige Unterschied nur als Trend erkennbar, jedoch nicht signifikant.

Eine andere Darstellung erlaubt einen genauen Überblick über den Zusammenhang zwischen den Methylierungs- und Expressionsergebnissen. Hierzu wurde jeder

Ergebnisse

untersuchten Zelllinie das Ergebnis direkt gegenüber gestellt. So ist z.B. zu erkennen, dass für ZNF671 die HPV-negative Zervixkarzinomzelllinie C33a keine Methylierung der Genregion ZNF671 nachgewiesen werden kann, dafür aber eine hohe Expression des Gens zu verzeichnen ist. Im Gegensatz dazu ist die Genregion ZNF671 in der Ovarialkarzinomzelllinie OvMz stark methyliert, was eine niedrige Expression des Gens nach sich zieht. Ein anderes Muster weist die Ovarialkarzinomzelllinie HOC7 für ZNF671 auf. In diesen Zellen ist das Gen ebenso stark methyliert, wie in den Zervixkarzinomzelllinien, es konnte aber auch eine deutliche Expression nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse sind exemplarisch für die vier Markerregionen ASTN1 (Abbildung 10), NXPH1 (Abbildung 11), SOX17 (Abbildung 12) und ZNF671 (Abbildung 13) im Folgenden zu sehen.

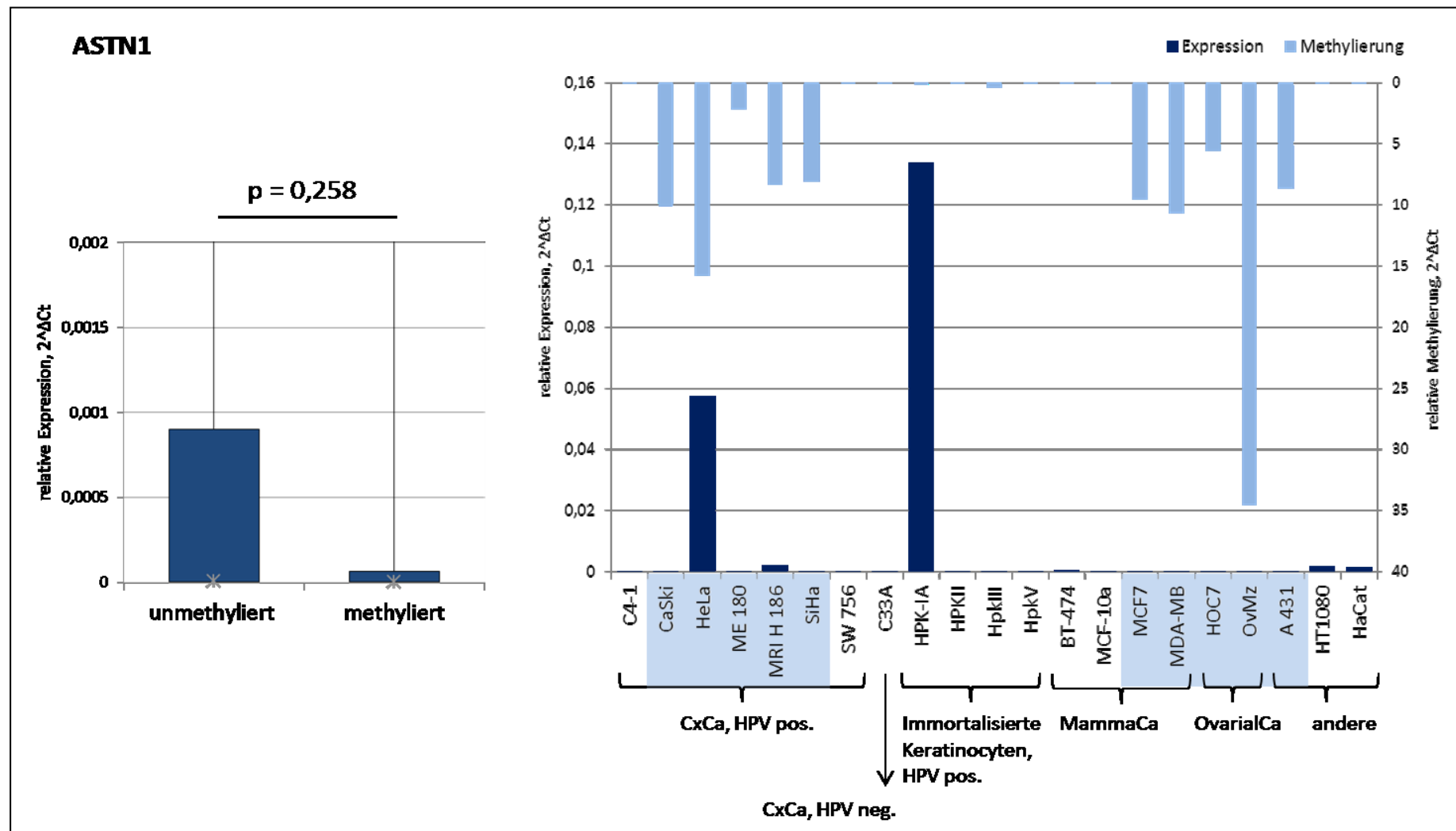


Abbildung 10 – Auswertung aller Zelllinien für ASTN1, Box-Plot und Säulendiagramm, Expression ist relativ zu HPRT dargestellt und Methylierung relativ zu ACTB, Signifikanzwert in der Box-Plot-Darstellung nach Mann-Whitney U Test, Signifikanz ist mit * gekennzeichnet, Zelllinien der „methyliert“-Gruppe sind im Säulendiagramm blau markiert

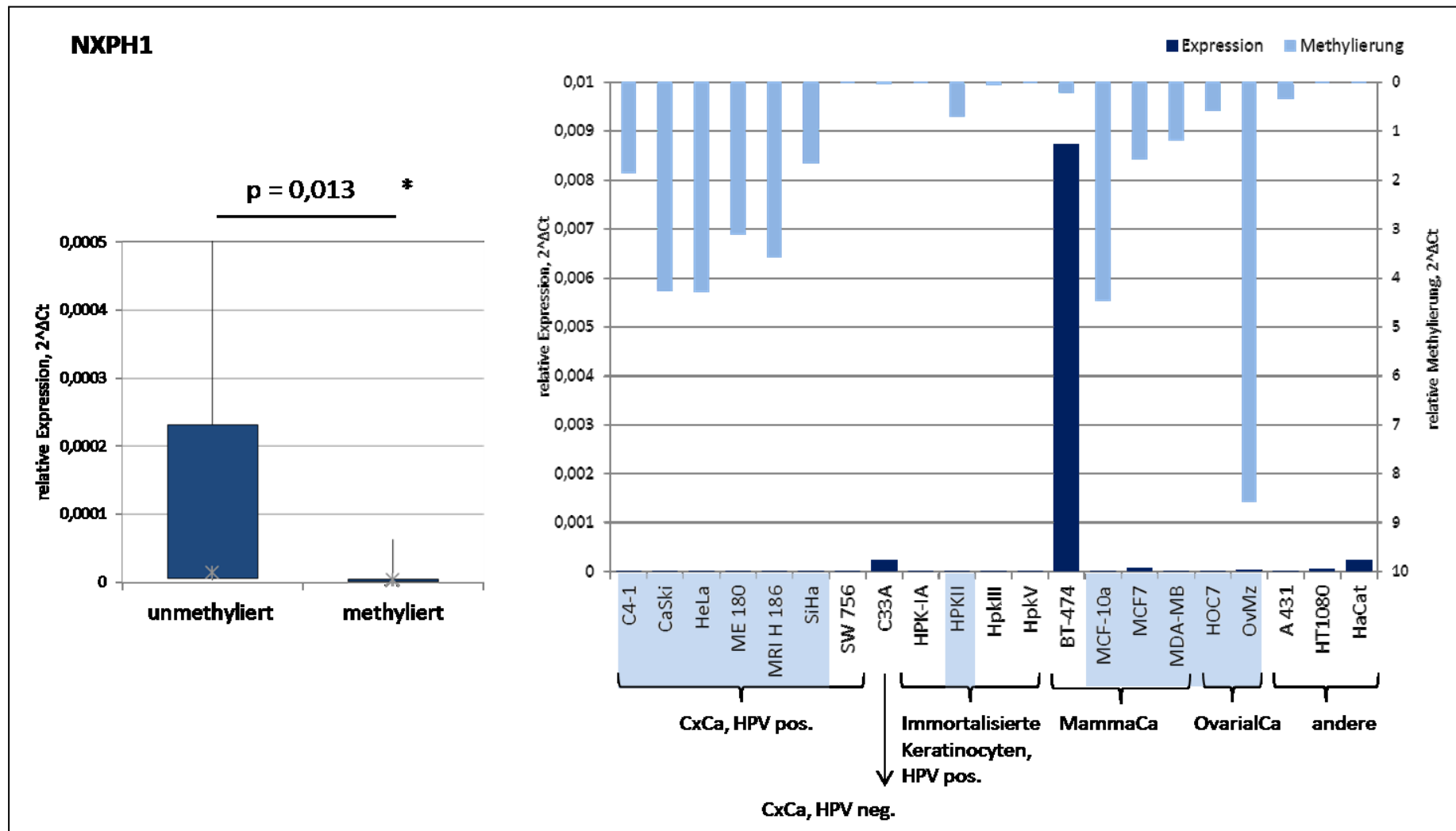


Abbildung 11 – Auswertung aller Zelllinien für NXPH1, Box-Plot und Säulendiagramm, Expression ist relativ zu HPRT dargestellt und Methylierung relativ zu ACTB, Signifikanzwert in der Box-Plot-Darstellung nach Mann-Whitney U Test, Signifikanz ist mit * gekennzeichnet, Zelllinien der „methyliert“-Gruppe sind im Säulendiagramm blau markiert

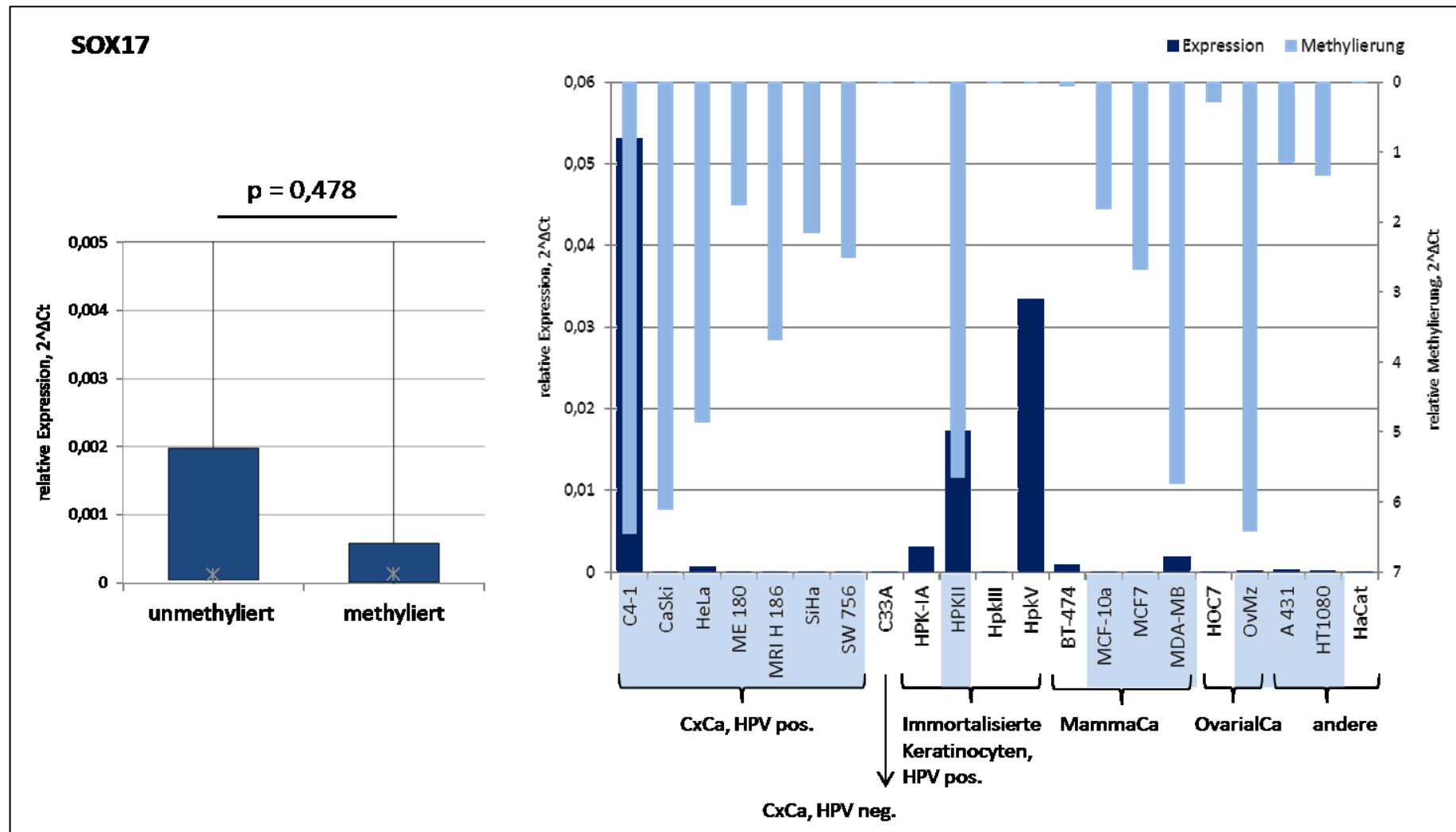


Abbildung 12 – Auswertung aller Zelllinien für SOX17, Box-Plot und Säulendiagramm, Expression ist relativ zu HPRT dargestellt und Methylierung relativ zu ACTB, Signifikanzwert in der Box-Plot-Darstellung nach Mann-Whitney U Test, Signifikanz ist mit * gekennzeichnet, Zelllinien der „methyliert“-Gruppe sind im Säulendiagramm blau markiert

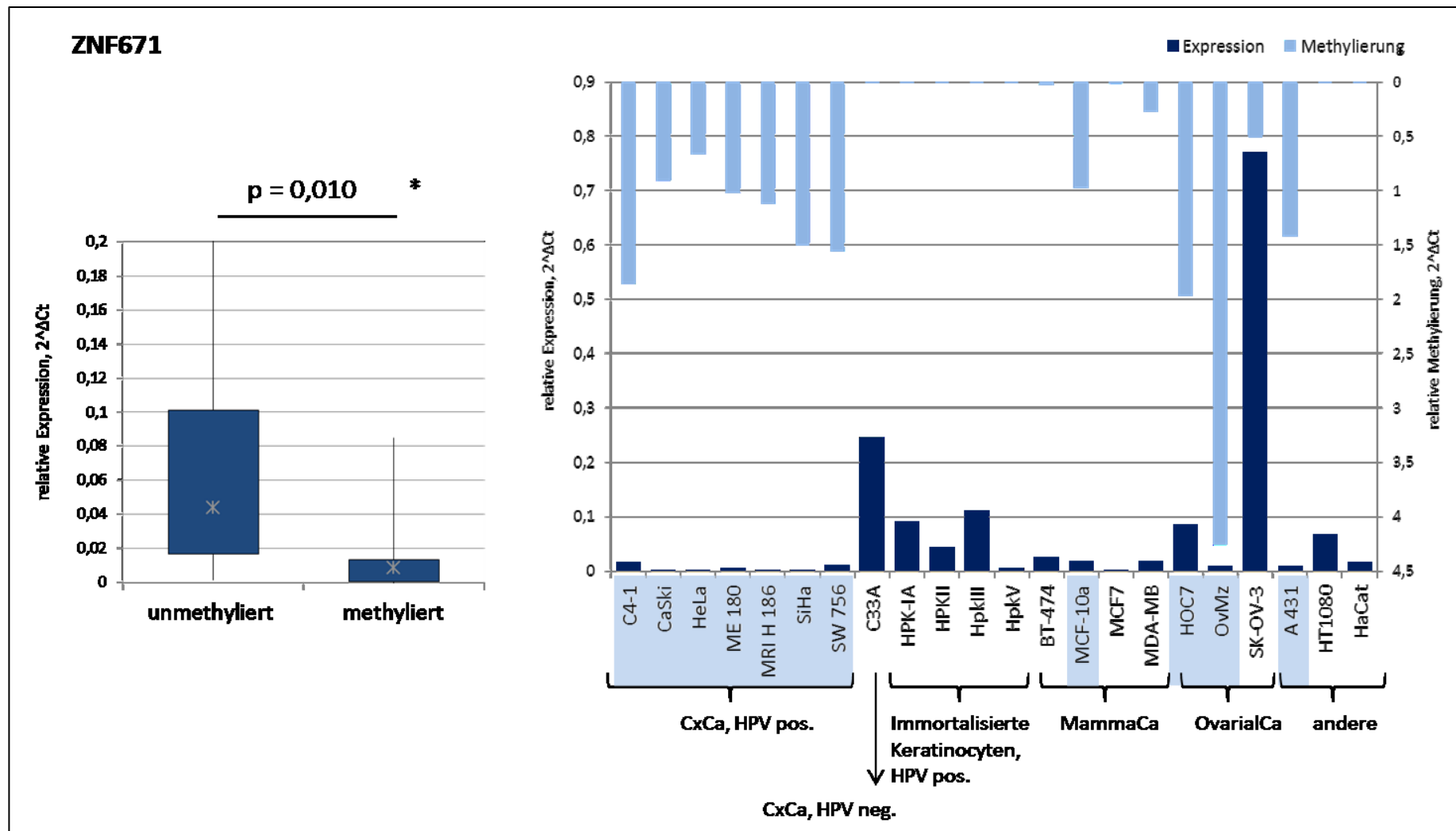


Abbildung 13 – Auswertung aller Zelllinien für ZNF671, Box-Plot und Säulendiagramm, Expression ist relativ zu HPRT dargestellt und Methylierung relativ zu ACTB, Signifikanzwert in der Box-Plot-Darstellung nach Mann-Whitney U Test, Signifikanz ist mit * gekennzeichnet, Zelllinien der „methyliert“-Gruppe sind im Säulendiagramm blau markiert

4.1.2 Expressions- und Methylierungsanalysen in Zervixkarzinomzellkulturen und humanen immortalisierten Keratinocyten (HPKs)

Nach einer ersten Auswertung, wobei alle unter 2.8.2 aufgelisteten Zelllinien Verwendung fanden, wurde nun eine engere Auswahl getroffen und nur die Zervixkarzinomzelllinien C4-1, CaSki, HeLa, ME 180, MRI H 186, SiHa, SW 756 und immortalisierte Keratinozyten-Zelllinien HPK IA, HPK II, HPK III und HPK V (Human Primary Keratinocytes) ausgewertet. Diese immortalisierten humanen Vorhaut-Keratinozyten exprimieren die Onkogene von HPV16 (bzw. HPV18) E6 oder E7 oder E6/7 [70, 86] sind aber nicht zerviko-karzinogenen Ursprungs. Ziel dieses Auswertemodus war es zu untersuchen, ob allein die Anwesenheit von HPV einen Einfluss auf den Methylierungs- und Expressionsgrad hat, oder ob die direkte Abstammung der Zellen aus einem Zervixkarzinom dazu führt, dass durch Methylierung die Expression der Gene herunterreguliert wird. Alle 15 Markergene zeigen eine stärkere Methylierung in den sieben Zervixkarzinomzelllinien als in den HPKs. Gleichzeitig dazu weisen neun Gene (ASTN1, DLX1, EDIL3, ITGA4, NXPH1, PCDHGB3, SOX17, ZNF568 und ZNF671) (60%) eine deutlich niedrigere Expression in der Gruppe der Zervixkarzinomzelllinien auf. Die vier Marker RXFP3, SSTR1, TRH und ZNF146 weisen keinen Expressionsunterschied in den beiden Gruppen auf und die Gene DMRTA2 und MEF2C zeigen einen Trend zur höheren Expression in den Zervixkarzinomzelllinien. Für die meisten Gene zeigt sich somit, dass deren Herabregulation der Expression nicht direkt mit der Anwesenheit von HPV in Verbindung steht. Für die vier Gene ASTN1, NXPH1, SOX17 und ZNF671 sind die Ergebnisse in Abbildung 14 gezeigt.

Eine erfolgreiche Berechnung der Signifikanz war aufgrund der wenigen Werte für die HPK-Gruppe nicht möglich.

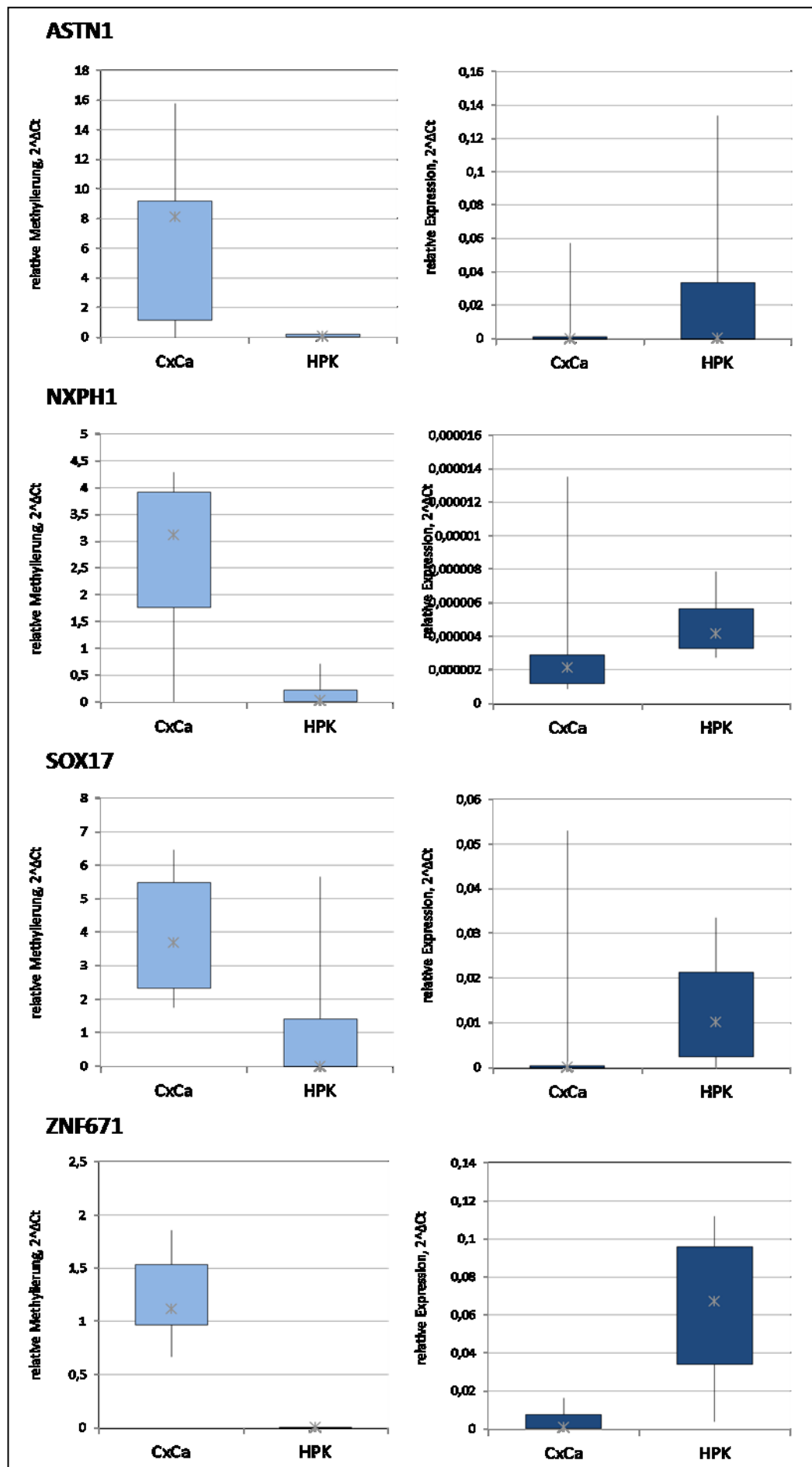


Abbildung 14 – Box-Plot-Darstellungen der Methylierung (links) und Expression (rechts) aller CxCa Zelllinien und HPKs, Methylierung ist relativ zu ACTB und Expression relativ zu HPRT dargestellt

4.1.3 Expressions- und Methylierungsanalysen nach einer Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin

Es wurde im Folgenden an sechs Zervixkarzinomzelllinien (CaSki, HeLa, ME 180, MRI H186, SiHa und SW756) untersucht, ob eine Veränderung im Methylierungslevel der Markerregionen auch eine Veränderung des Expressionslevels nach sich zieht. Dazu wurden die Zellkulturen zum einen mit dem Agens 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-CdR) behandelt und zum anderen unter Standardbedingungen gehalten. Für alle Marker wurde dann überprüft, ob die Methylierung des jeweiligen Gens tatsächlich herabgesetzt werden konnte. Dies war zum Großteil möglich, allerdings gab es für einige Gene auch den Umstand, dass für eine oder mehrere der untersuchten Zelllinien die Behandlung mit dem Agens nicht den gewünschten Methylierungsunterschied erbrachte, sondern eher den konträren – so z.B. in der Zelllinie HeLa für das Gen NXPH1. Oftmals war es auch der Fall, dass die 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Kultivierung keinen messbaren Unterschied in der Methylierung zeigte (z.B. in der Zelllinie SW756 für das Gen SOX17). Prinzipiell konnte man beobachten, dass die Zellen unter der Kultivierung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin litten und die DNA- und RNA-Qualität und -Quantität stark nachließ. Dies spiegelte sich in schlechteren (d.h. höheren) Ct-Werten der Housekeeping-Gene wider. Der Grund hierfür liegt darin, dass 5-Aza-2'-Deoxycytidin die komplette Erbsubstanz hypomethyliert und nicht nur spezifische Gene. Dadurch sind eben auch Gene betroffen, die essentiell für die Lebenserhaltung der Zellen sind.

Neben der Kontrolle der Methylierung war es aber von besonderem Wert zu überprüfen, ob die Expression der Gene (und somit auch die Funktion des Proteins) wiederhergestellt werden kann. Für die acht Markerregionen (53,3%) ASTN1, DMRTA2, ITGA4, NXPH1, SOX17, TRH, ZNF568 und ZNF671 konnte dies gezeigt werden. Für diese acht Gene wurde Expression durch Herabsetzung der Methylierung wiederhergestellt. Für die restlichen 46,7%, also sieben Marker (DLX1, EDIL3, MEF2C, RXFP3, SSTR1 und ZNF146) konnte keine Wiederherstellung der Expression nach einer Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin gemessen werden. Die Ergebnisse sind für die vier Marker ASTN1, NXPH1, SOX17 und ZNF671 in nachfolgender Abbildung 15 dargestellt.

Ergebnisse

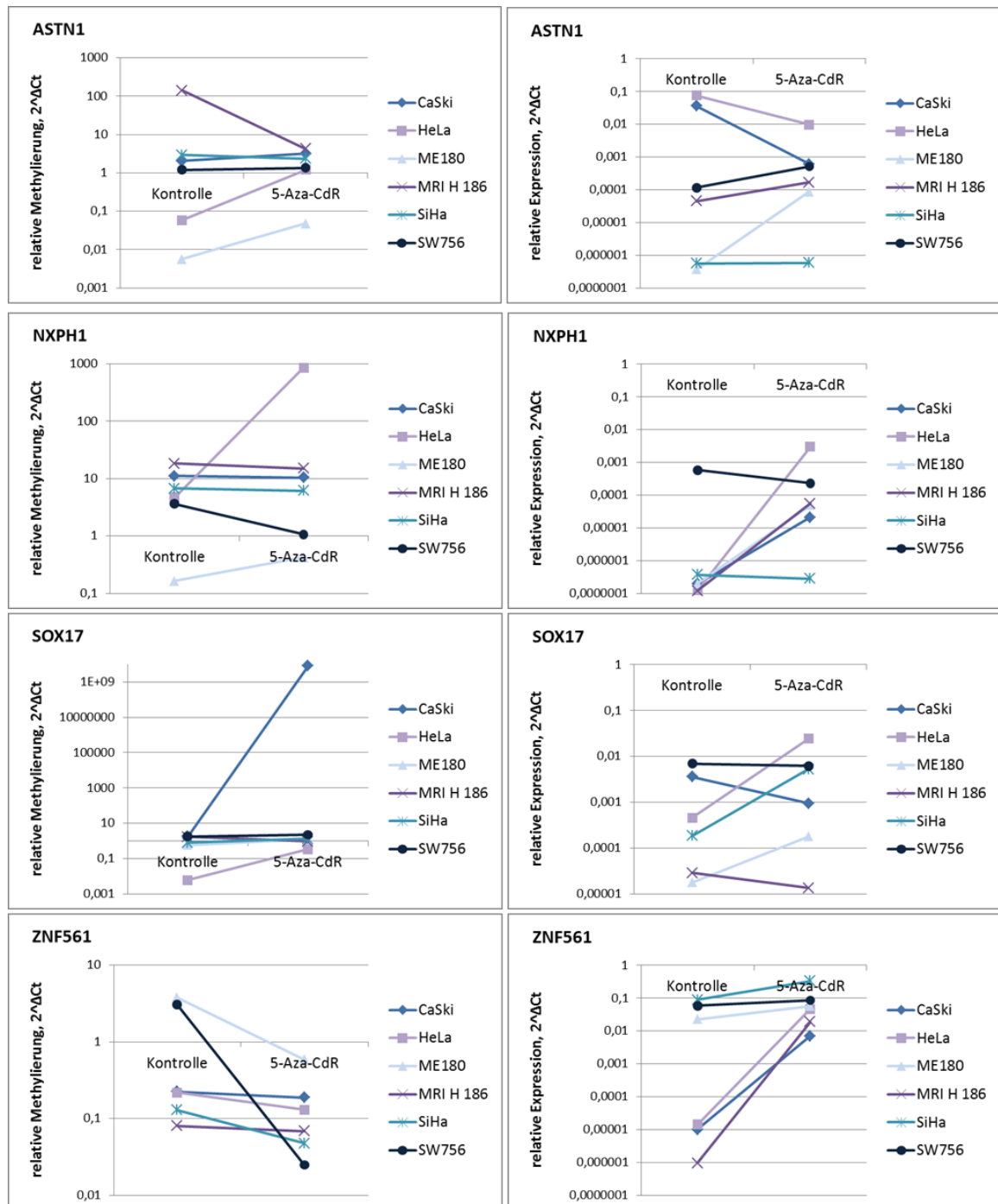


Abbildung 15 –Punktdiagramm für die Methylierungs- (links) und Expressionsänderung (rechts) nach einer Behandlung der Zelllinien mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin, Werte sind logarithmisch aufgetragen und zur besseren Darstellung wurden die beiden Messpunkte „Kontrolle“ (Kultivierung der Zellen unter Standardbedingungen) und „5-Aza-CdR“ (Kultivierung der Zellen mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin) durch eine Linie verbunden, Methylierung ist relativ zu ACTB und Expression relativ zu HPRT dargestellt

Ergebnisse

Fasst man die Messpunkte „Kontrolle“ und „5-Aza-CdR“ für alle sechs Zelllinien zusammen, so kann man die Signifikanz der beiden Gruppen mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ermitteln. Für das Gen ZNF671 kann somit eine signifikante Hypomethylierung und gleichzeitig eine signifikante Hochexpression ermittelt werden. Dies ist in Abbildung 16 durch Box-Plots verdeutlicht.

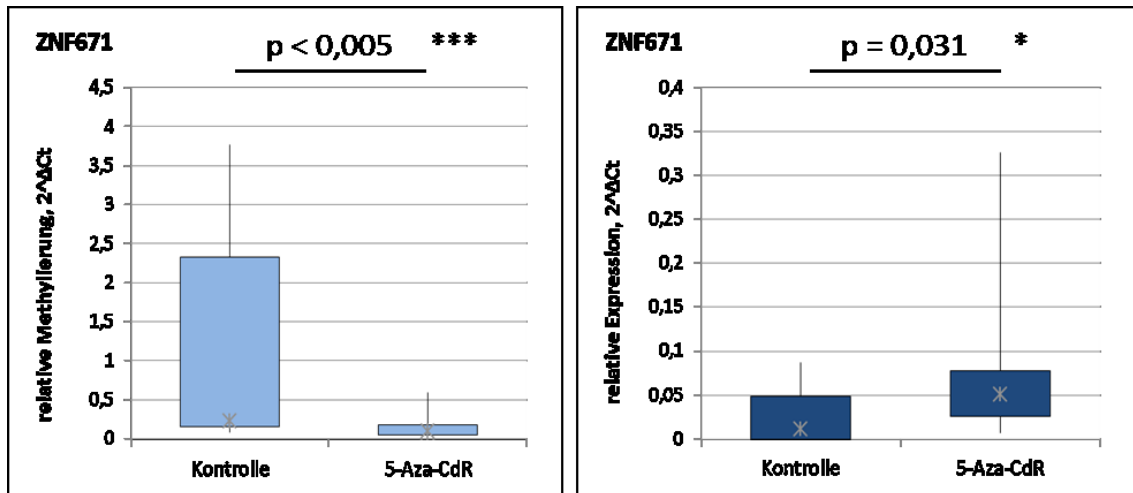


Abbildung 16 – Box-Plot-Darstellungen der relativen Methylierung (links) und relativen Expression (rechts) unter einer Behandlung der CxCa Zelllinien CaSki, HeLa, ME 180, MRI H186, SiHa und SW756 unter Standardbedingungen (Kontrolle) und mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-CdR) für ZNF671, Methylierung ist relativ zu ACTB und Expression relativ zu HPRT aufgetragen

4.1.4 Expressions- und Methylierungsanalysen an Gesamtgewebeproben

DNA aus Gesamtschnitten war von 63 Patientinnen verfügbar. Darunter waren 22 Gewebeproben von HPV-positiven Patientinnen ohne histologischen Hinweis auf eine Neoplasie (als „Normalgewebe“ bezeichnet), 21 CIN3- und 20 CxCa-Proben. Exemplarisch sind in Abbildung 17 Hämatoxylin-Eosin-Färbungen jeweils einer Gewebeentität in zwei Vergrößerungen dargestellt (10 x 5-fach und 10 x 10-fach). Das Hämatoxylin färbt die Zellkerne durch Anlagerung an die negativen Phosphatgruppen der DNA blau-violett [87] und gleichzeitig färbt das Eosin Y die eosinophilen Strukturen wie Cytoplasma rot bis pink. Zu erkennen ist an den Beispielen deutlich, dass die schichtbezogene Differenzierung des zervikalen Plattenepithels zur CIN3 und dann vor allem zum Zervixkarzinom hin aufbricht. Die Differenzierung immer höherer, oberflächennaher Schichten ist im CIN3-Status gestört und beim Zervixkarzinom völlig aufgelöst. Beim Zervixkarzinom ist die Epithelschicht nicht mehr auszumachen. Tumorinseln dominieren in diesem Status.

Ergebnisse

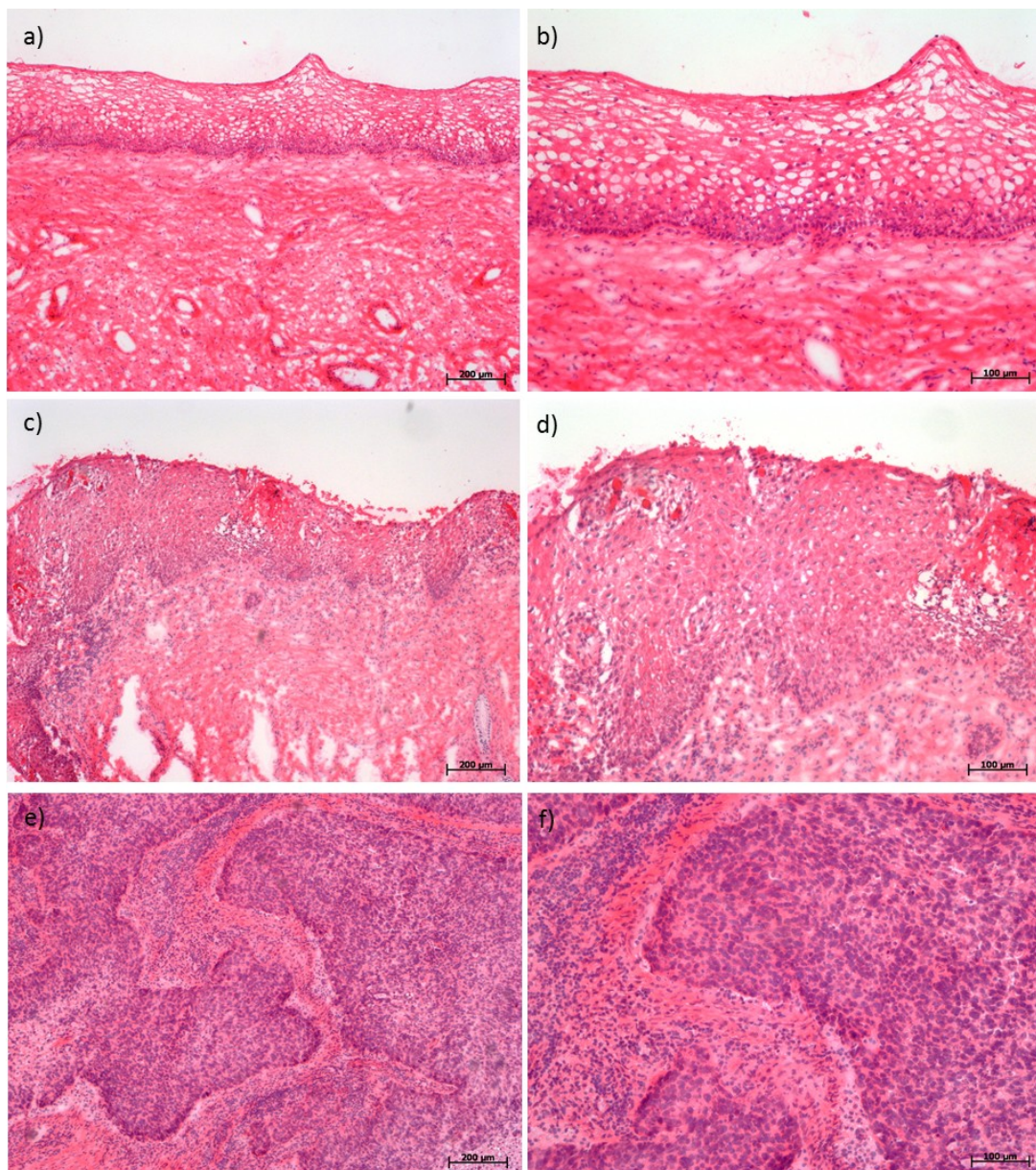


Abbildung 17 – HE-Färbungen verschiedener Gewebe, links (a, c, e) 10 x 5-fache Vergrößerung, rechts (b, d, f) 10 x 10-fache Vergrößerung

a + b) Normalgewebe 2675 N

c + d) CIN3 2069 T

e + f) CxCa 5240 T3a

Aus den 63 Gewebeproben wurde jeweils DNA und RNA isoliert um die entsprechenden Methylierungs- und Expressionsanalysen für neun (ASTN1, DLX1, DMRTA2, ITGA4, NXPH1, PCDHGB3, SOX17, TRH und ZNF671) der 15 Markergene durchzuführen. Es wurde sowohl RNA, als auch DNA aus allen 63 Patientinnen isoliert und die jeweiligen PCRs durchgeführt. Bei der Auswertung wurden dann aber Proben, die einen zu hohen ACTB-Wert hatten und somit zu niedrig konzentriert waren, ausgeschlossen. Lieferten diese Proben für das GOI dennoch einen Ct-Wert, wurden

Ergebnisse

sie in die Bewertung mit eingeschlossen (Berechnung siehe 7.4). Der Grund für den oftmals schlechten, d.h. hohen ACTB-Wert liegt wohl an der schlechten Qualität der RNA nach Isolation. Diese liegt zum Großteil nur bruchstückhaft vor, sodass zwar quantitativ eine ausreichende Menge gemessen werden kann, aber in der anschließenden RT-PCR nicht genug des kompletten zu amplifizierenden Bereichs vorhanden ist. Dadurch hat man in der anschließenden qPCR nicht ausreichend und vor allem nicht für jede Probe gleich viel RNA-Menge. Die Normalisierung der Ct-Werte ist hier umso wichtiger. Als Housekeeping-Gen wurde zur Normalisierung der Methylierung wieder ACTB und zur Normalisierung der Expression ebenfalls ACTB verwendet, da das Expressionslevel der Markerregionen im Gewebe diesem HKG ähnlicher ist als HPRT.

Das Methylierungslevel stieg für alle neun untersuchten Genregionen – mit Ausnahme von TRH – vom Normalgewebe zum CxCa-Gewebe an. Gleichzeitig sank im Gegensatz dazu das Expressionsniveau für die drei (33,3%) Gene NXPH1, PCDHGB3 und ZNF671. Die Herunterregulierung der Expression war für die Markerregion ZNF671 deutlich, allerdings nicht signifikant. Für die Markerregion NXPH1 konnte ein signifikanter Abfall der Expression vom Normal- zum CIN3- und zum CxCa-Gewebe ermittelt werden. Die übrigen sechs Markerregionen ASTN1, DLX1, DMRTA2, ITGA4, SOX17 und TRH zeigten keinen Expressionsunterschied in den drei Gewebeentitäten. Die Ergebnisse für die vier Marker ASTN1, NXPH1, SOX17 und ZNF671 sind als Box-Plots in Abbildung 18 zu sehen.

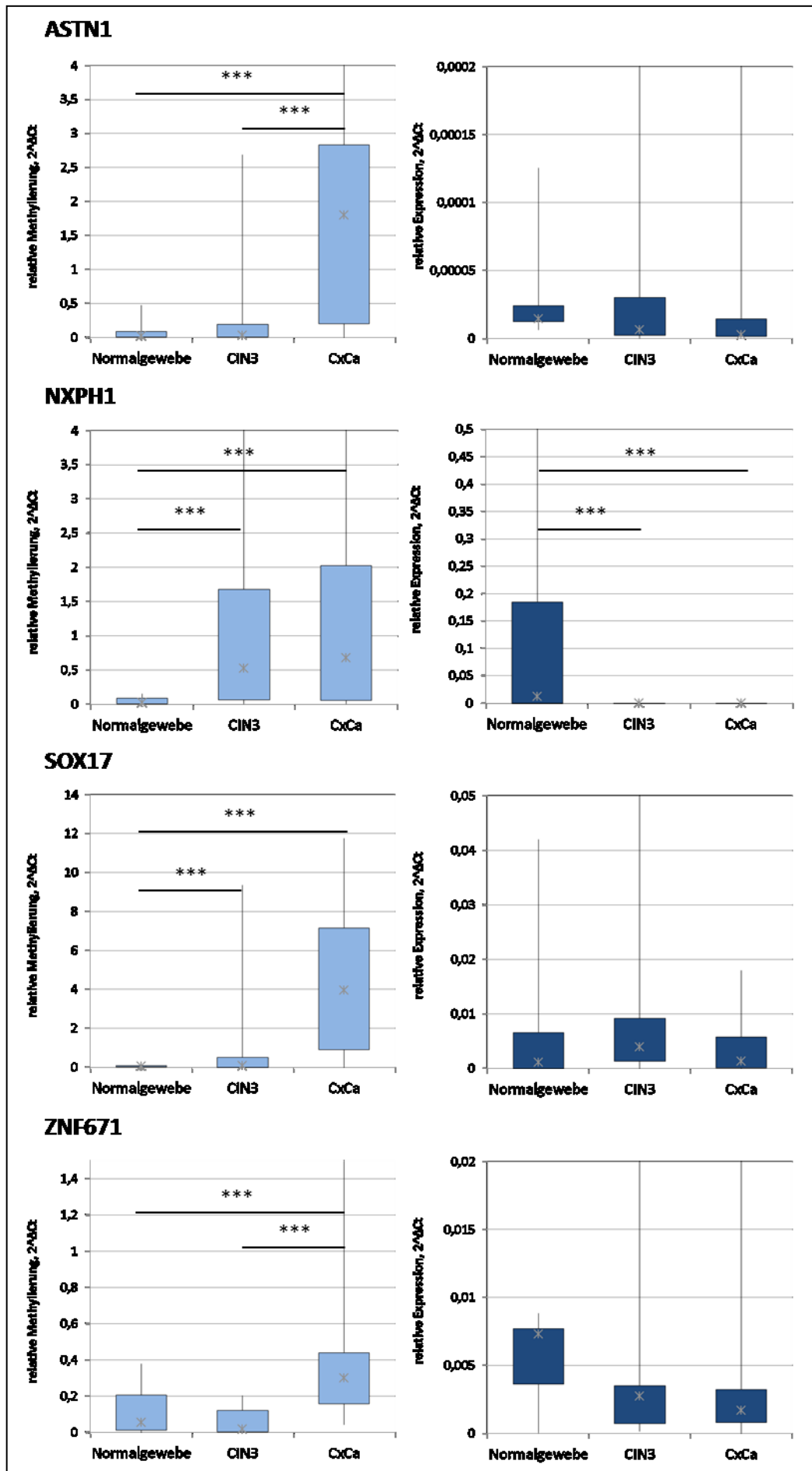


Abbildung 18 – Box-Plot-Darstellungen der Methylierung (links) und Expression (rechts) der Gesamtgewebeproben, Methylierung und Expression sind relativ zu ACTB dargestellt

4.1.5 Expressions- und Methylierungsanalysen an mikrodisektiertem Gewebe

Um zu vermeiden DNA aus Stromazellen und anderen dem dysplastischen Gewebe umliegenden Zellen mit in die Untersuchung einzubeziehen, wurden jeweils zehn Normal-, CIN3- und CxCa-Gewebe mikrodisektiert. Hierbei erhält man Zellmaterial, welches homogen ist und nur aus dem zu untersuchenden Gewebe stammt. Dadurch ist der Tumorzellanteil in der Probe deutlich höher, was zu konsistenten Ergebnissen führt. In Abbildung 19 sieht man, dass nur das spezifische Gewebe genommen wurde für die Isolation der Nukleinsäuren. Das umliegende Interstitium wurde nicht verwendet und kann nach der Mikrodisektion noch angefärbt werden.

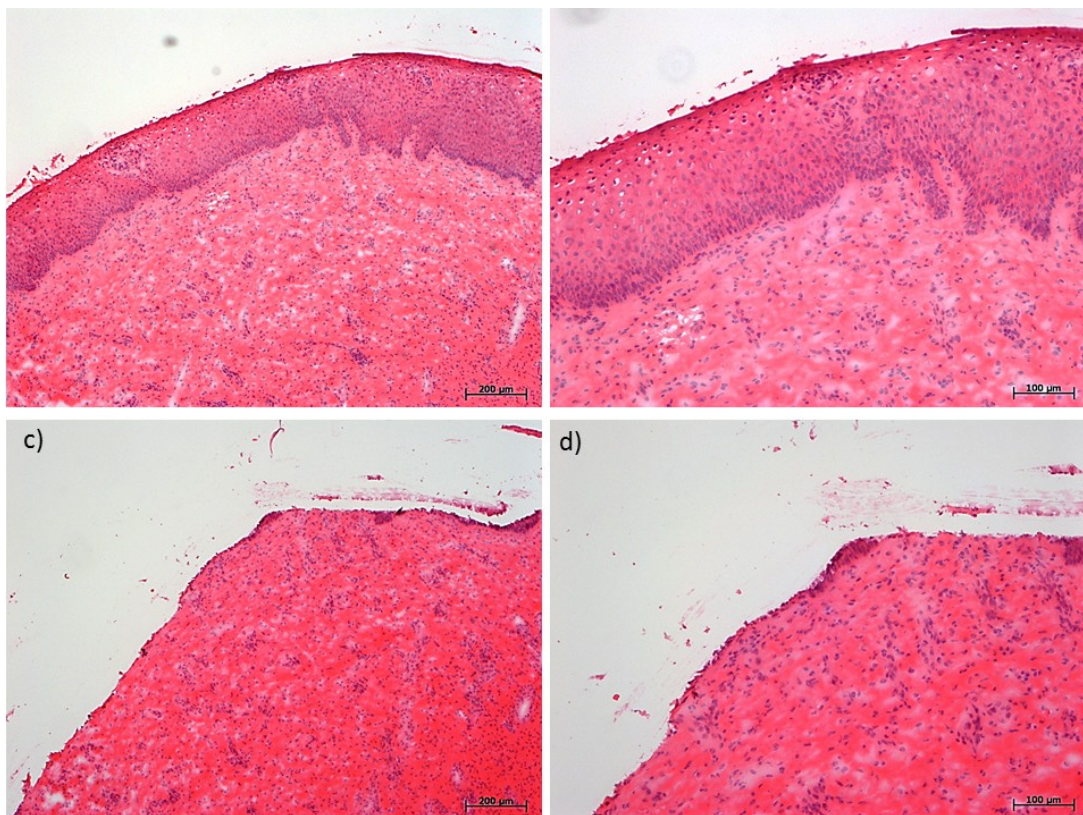


Abbildung 19 – HE-Färbungen des Schnittes 2674 T (CIN3), links (a, c) 10 x 5-fache Vergrößerung, rechts (b, d) 10 x 10-fache Vergrößerung

a + b) vor der Mikrodisektion

c + d) nach der Mikrodisektion, Epithelgewebe wurde ausgekratzt

Aufgrund der limitierten DNA-Menge, welche aus der viel aufwendigeren Methode im Vergleich zur Untersuchung von Gesamtschnitten resultiert, wurde die Untersuchung an den vier wichtigsten Markerregionen ASTN1, NXPH1, SOX17 und ZNF671 durchgeführt. Bei der Untersuchung mikrodisektiertem Materials konnte für alle vier Markerregionen eine Hypermethylierung und gleichzeitige Herabregulierung der Expression nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

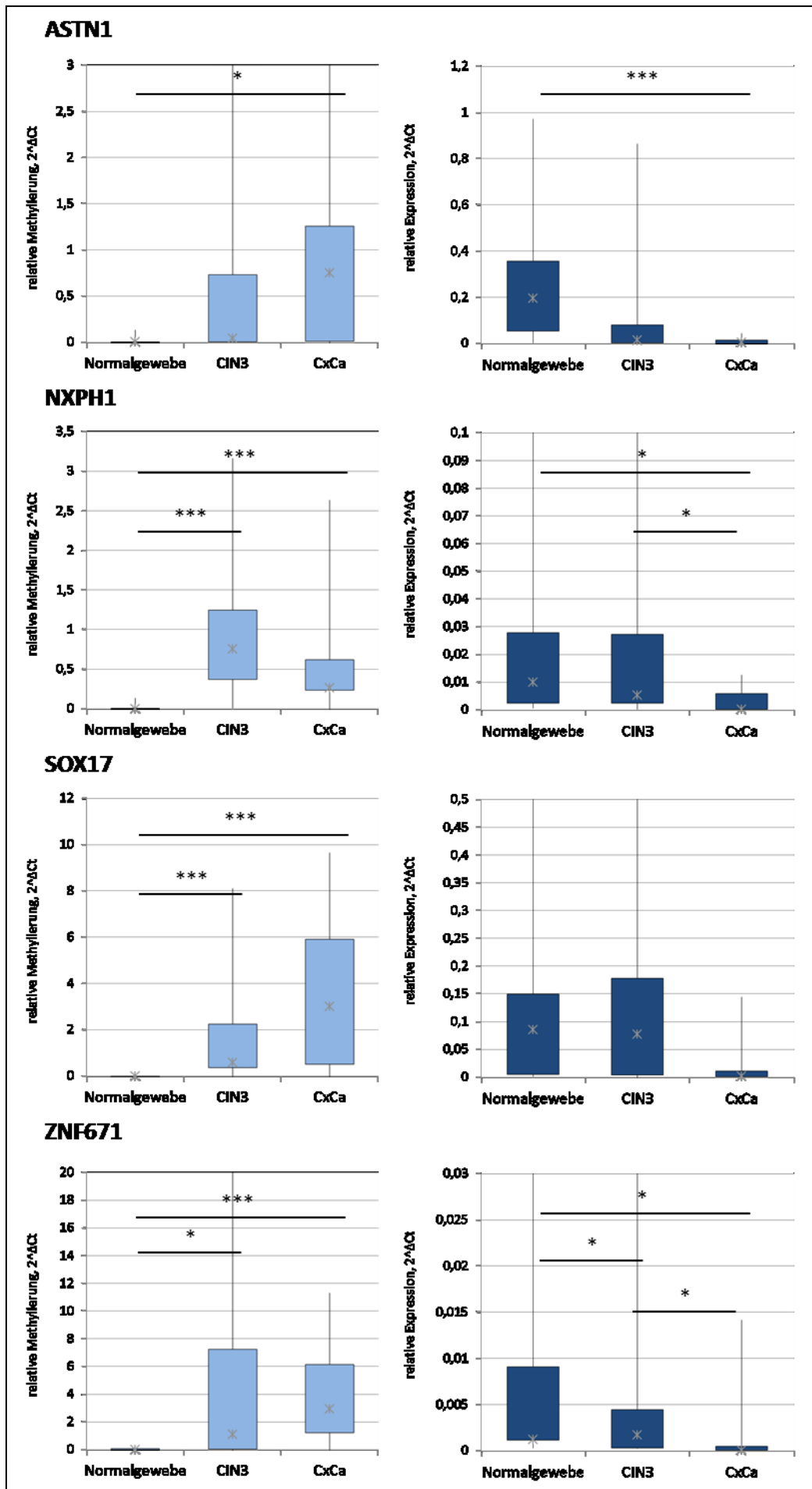


Abbildung 20 – Box-Plot-Darstellungen der Methylierung (links) und Expression (rechts) der mikrodissezierten Gewebeproben, Methylierung und Expression sind relativ zu ACTB dargestellt

4.1.6 Zusammenhang Methylierung und Expression

Die Untersuchungen an Zellkultur-DNA unter Normalbedingungen, sowie unter einer 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Behandlung und an Gewebeproben zeigten, dass für das Markergen ZNF671 ein negativer Zusammenhang zwischen Methylierung und Expression besteht. Dadurch gilt es als potentiell Tumorsuppressorgen in der Zervixkarzinogenese. In der nachfolgenden Tabelle sind nochmals alle Ergebnisse der Methylierungs- und Expressionsuntersuchungen von ZNF671 mit den zugehörigen p-Werten im Überblick dargestellt.

Tabelle 14 – Ergebnisübersicht über alle Methylierungs- und Expressionsuntersuchungen für ZNF671

Versuch	Ergebnis	p-Wert
Vergleich methylierte-unmethylierte Zelllinien (4.1.1)	Methylierung ↑	0,010 *
	Expression ↓	
Vergleich CxCa-Zelllinien und HPKs (4.1.2)	Methylierung ↑	-
	Expression ↓	
5-Aza-CdR-Behandlung von CxCa-Zelllinien (4.1.3)	Methylierung ↑	< 0,005 ***
	Expression ↓	0,031 *
Untersuchung Gesamtschnitte (4.1.4)	Methylierung ↑	< 0,005 ***
	Expression ↓	> 0,05
Untersuchung mikrodisektierte Gewebe (4.1.5)	Methylierung ↑	0,005 **
	Expression ↓	0,02 *

Da für alle anderen untersuchten Markergene dieser Zusammenhang weniger bis gar nicht vorhanden war, erfolgten alle nachfolgenden Untersuchungen ausschließlich für das interessanteste Gen ZNF671.

4.2 RNA-RNA *in situ* Hybridisierung von ZNF671

Die RNA-RNA *in situ* Hybridisierung erlaubt die Untersuchung der Genexpression im zellulären Kontext. Es wurden dazu jeweils vier Normal-, CIN3- und CxCa-Gewebeschnitte mit der spezifischen Sonde für die mRNA gegen ZNF671 hybridisiert, visualisiert und anschließend mikroskopisch ausgewertet. Bei der Auswertung war es wichtig den direkten Vergleich der sense- und antisense-Sonde vorzunehmen. Nur hierdurch kann der Unterschied zwischen positiv gefärbten dunkelblauen Zellen unter Behandlung mit der antisense und negativen Zellen wahrgenommen werden (siehe

Ergebnisse

Abbildung 21). Die Bilder verdeutlichen exemplarisch, dass positive Zellen fast ausschließlich in Normalgeweben und da insbesondere in der Basalzellschicht zu sehen waren. Vereinzelt waren auch positive Zellen in einem CIN3-Gewebe zu sehen, aber diese waren dann nicht so gehäuft wie im normalen Plattenepithelium.

Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Färbeergebnis und dem Expressionsergebnis aus den qPCR-Untersuchungen konnte nicht gezeigt werden. So weisen zum Beispiel die Proben 2678 N und 2682 N ein sehr ähnliches qPCR-Ergebnis auf, eine positive Färbung konnte aber nur für die Probe 2678 N erzielt werden. Prinzipiell muss gesagt werden, dass sich die Färbung als recht schwierig und aufwendig herausstellte und diese Methode nicht die erste Wahl sein sollte zur Untersuchung der Expression.

Ergebnisse

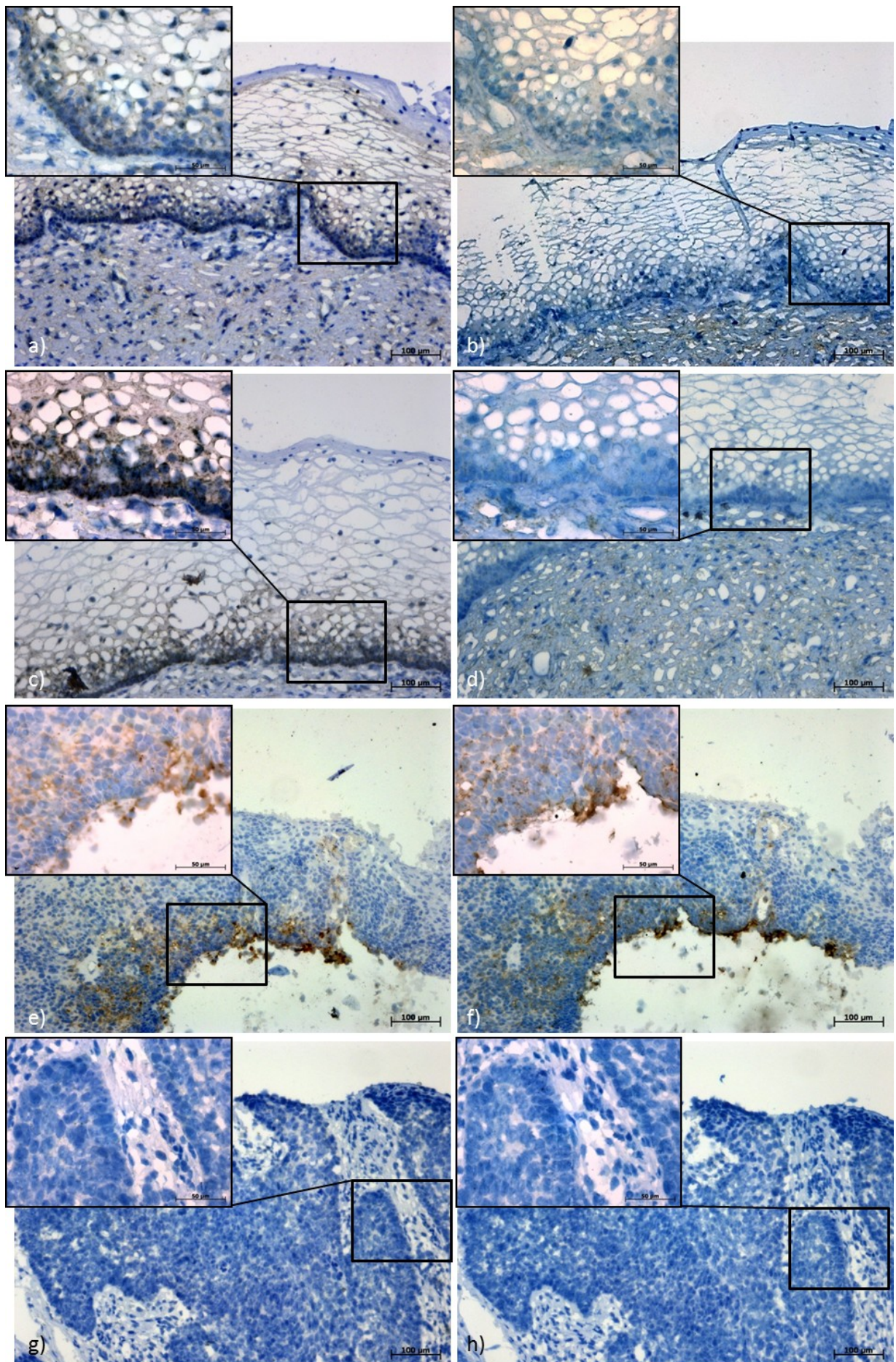


Abbildung 21 – mikroskopische Aufnahmen einiger RNA-RNA in situ Hybridisierungen (10 x 5-fach vergrößert und Ausschnitt 10 x 40-fach vergrößert), links (a, c, e und g) ist antisense- und rechts (b, d, f und h) sense-Sonde dargestellt,
a + b) Normalgewebe 2678 N c + d) Normalgewebe 2684 N (a + c dunkelblaue bis schwarze Zellen zu sehen)
e + f) CIN3 5414 T g + h) CxCa 4112 T2b

Ergebnisse

In tabellarischer Form ist die Auswertung wie folgt zu sehen.

Tabelle 15 – Mikroskopische Auswertung der RNA-RNA *in situ* Hybridisierung und gleichzeitig Expressionsergebnisse aus den qPCR-Versuchen (4.1.4)

Entität	Probe	Sonde	Bewertung der Färbung	relative Expression
Normal-gewebe	2678 N	antisense	Färbung (v.a. in Intermediärschicht)	0,00345
		sense	keine Färbung	
	2682 N	antisense	keine Färbung	0,00364
		sense	keine Färbung	
	2683 N	antisense	leichte Färbung	0,00173
		sense	keine Färbung	
	2684 N	antisense	Färbung	0,00868
		sense	keine Färbung	
	CIN3	2055 T	antisense	0,00029
			sense	
		4372 T	antisense	0,0005
			sense	
		5414 T	antisense	0,00002
			sense	
		5427 T	antisense	0,00024
			sense	
	CxCa	1509 T1b	antisense	0,0017
			sense	
		2319 T2b	antisense	0,00175
			sense	
		4112 T2b	antisense	0,00078
			sense	
		5254 T1b	antisense	0,00095
			sense	

4.3 Untersuchung der Transkriptvarianten von ZNF671

Durch das online frei zur Verfügung stehende Genominformationsportal „Ensembl“ [<http://www.ensembl.org/index.html>] ist bekannt, dass es für das Gen ZNF671 sieben verschiedene Transkriptvarianten gibt, von denen drei proteinkodierend sind (siehe Tabelle 16). Diese sieben verschiedenen Varianten wurden im Folgenden genauer untersucht.

4.3.1 Theoretische Betrachtung

Allgemeines

Über die Funktion des Proteins ZNF671 ist nichts Näheres bekannt. Es gehört als Mitglied der Zink-Finger-Protein Familie zu den Transkriptionsfaktoren und ist somit vermutlich in die Transkriptionsregulation involviert. Subzellulär ist es dadurch höchstwahrscheinlich im Nukleus lokalisiert. Strukturell sind Proteine der ZNF-Familie ähnlich aufgebaut. Sie besitzen eine in sich geschlossene Domäne, welche durch Zinkionen stabilisiert wird, die über entsprechend in der Domäne angeordnete Cysteine und Histidine komplexiert sind. [88]. Die Klasse der C_2H_2 -like Zink-Finger, zu denen ZNF671 aufgrund seiner Sequenzhomologie gezählt werden muss, besitzt eine sich wiederholende Aminosäure-Sequenz aus 28 bis 30 Aminosäuren, einen β -Hairpin sowie eine α -Helix. Die DNA-Bindung erfolgt über die große Furche der DNA (über N-Terminus der α -Helix) [89], wobei die Spezifität der Transkriptionsfaktoren durch die Seitenketten-Basen-Interaktionen erreicht wird. Zusätzliche Wechselwirkungen mit dem Phosphatrückgrat und zwischen benachbarten Zinkfingern tragen ebenfalls zu einer hohen Bindungsaffinität bei [90]. Die DNA-Erkennung erfolgt über die Seitenkette der α -Helix-Oberfläche [89]. Die Struktur eines C_2H_2 -like Zink-Fingers ist repräsentativ in Abbildung 22 zu sehen.

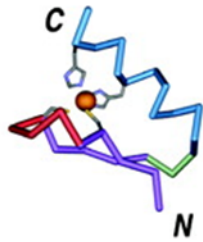
Representative Struktur	Ligandenvermittlung
	<ul style="list-style-type: none"> • bestehen aus β-Hairpin und α-Helix • zwei Zink-Liganden werden durch einen Zink-Knuckle beigetragen • beide anderen Liganden kommen aus C-terminalen Ende der α-Helix

Abbildung 22 – Struktur eines C_2H_2 -like Zink-Fingers (modifiziert nach Krishna *et al.* 2003)

Außerdem kann man ZNF671 noch zu den Krüppel-Typ ZNFs (KZNF) zuordnen. Diese besitzen drei oder mehrere ZNF-Motive, die tandemartig angeordnet sind. Die KZNF-Familien haben eine bedeutende Rolle in der Evolution der Eukaryoten gespielt und sind in verschiedenen Linien unabhängig voneinander entstanden [91]. ZNF671 besitzt

Ergebnisse

außerdem noch eine KRAB-Domäne (Krüppel associated Box Domäne), welche über DNA-Bindung die Transkription reprimieren kann [92].

Von ZNF671 sind sieben Transkriptvarianten bekannt. Welche Transkriptvariante während der Translation der Proteinbiosynthese tatsächlich zu einem funktionierenden Protein führt und welche Varianten wieder abgebaut werden, darüber gibt das Genominformationsportal „Ensembl“ Auskunft (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16 – Übersicht über die sieben Transkriptvarianten von ZNF671

Transkriptvariante	Anzahl der Basenpaare im Transkript	Anzahl der Aminosäuren im Protein	Biotyp (lt. Ensembl)
ZNF671-001	2431	534	proteinkodierend
ZNF671-201	2379	556	proteinkodierend
ZNF671-003	977	56	proteinkodierend
ZNF671-004	2903	107	Nonsense vermittelt, wird abgebaut
ZNF671-002	1932	56	Nonsense vermittelt, wird abgebaut
ZNF671-006	460	-	prozessiertes Transkript
ZNF671-005	418	-	prozessiertes Transkript

Die Intron-Exon-Verhältnisse sind in Abbildung 23 dargestellt.

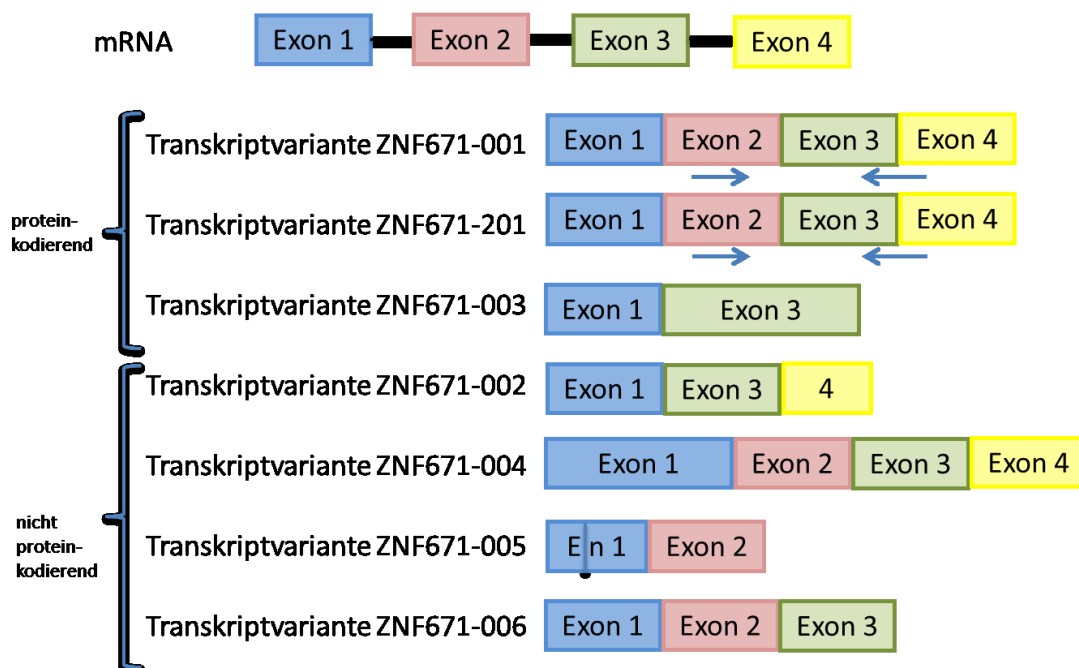


Abbildung 23 – Übersicht über die verschiedenen Transkriptvarianten von ZNF671, Exonlänge entspricht im Verhältnis der Länge der Rechtecke, Expressionsprimer sind als Pfeil dargestellt

Ergebnisse

Die Primer zur Bestimmung der Expression von ZNF671 liegen im zweiten Exon (Forward) und im Exonübergang von Exon drei zu vier (Reverse) (als blaue Pfeile in Abbildung 23 dargestellt). Somit decken sie die beiden proteinkodierenden Transkriptvarianten ZNF671-001 und ZNF671-201 ab. Man findet in der Literatur unterschiedliche Aussagen, in welchen Zellen und Organen ZNF671 hochexprimiert vorliegt. So findet man zum Beispiel in der Datenbank des Europäischen Bioinformatik-Instituts (EMBL-EBI), dass ZNF671 im Kleinhirn (Cerebellum) verstärkt exprimiert wird, hingegen in der gesunden Zervix kaum vorkommt. Ergebnisse aus Untersuchungen von Zervixkarzinom-Zelllinien zeigen die gleichen Ergebnisse wie in der vorliegenden Arbeit. In der Zelllinie C33a findet man das Transkript von ZNF671 verstärkt vor, demgegenüber in CaSki wenig bis gar nicht (Expression Atlas results for ENSG00000083814). Aussagen darüber, welche Transkriptvariante genau in der Zervix exprimiert wird, sind in den Genomportalen nicht zu finden. Dies wurde im Zuge der Arbeit genauer untersucht (siehe 4.3.2).

Unterscheidung ZNF671-001 – ZNF671-201

Die beiden Transkriptvarianten 001 und 201 unterscheiden sich laut Ensembl darin, dass ZNF671-001 eine Größe von 2.431 Basenpaaren und das Protein 534 Aminosäuren besitzt, wohingegen ZNF671-201 2379 Basenpaare groß ist und das entsprechende Protein aus 556 Aminosäuren besteht (auch siehe Tabelle 16). Dabei ist es so, dass alle Basen ab dem Startcodon ATG bis zur Position 1.602 identisch sind. An dieser Stelle kommt es nun für Variante 201 zu einem Wegfall eines Thymins, was zur Folge hat, dass sich das folgende Leseraster verschiebt (Frameshift) und an späterer Stelle als in 001 ein Stoppcodon entsteht. Die Sequenz und der Sequenzunterschied sind in Abbildung 24 zu sehen

Ergebnisse

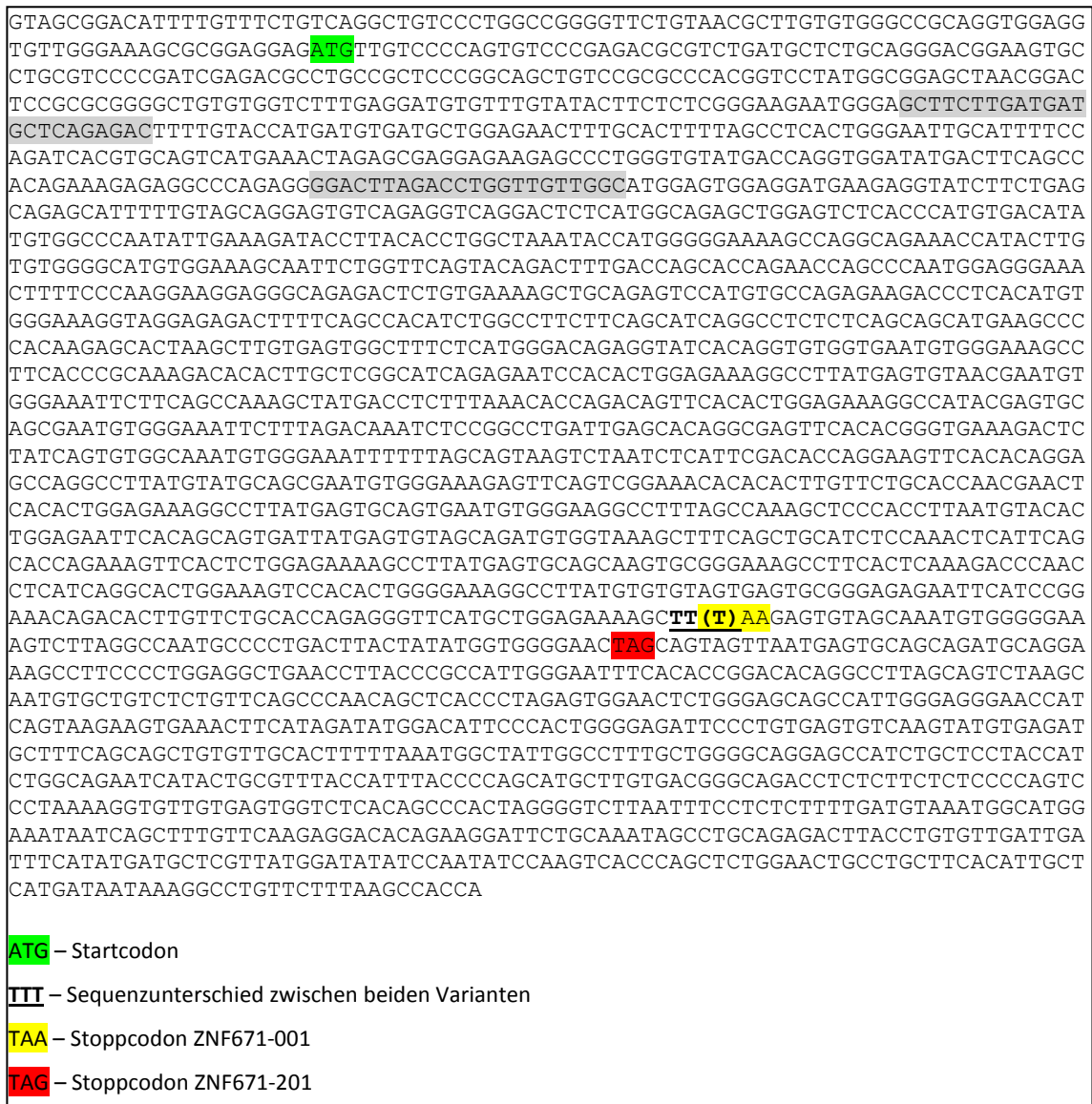


Abbildung 24 – Basenpaarsequenz der Transkriptvarianten ZNF671-001 und ZNF671-201, Sequenzunterschiede sind farblich hervorgehoben

4.3.2 Expressionsuntersuchungen in der Zervix

Zur Untersuchung, welche Transkriptvariante von ZNF671 tatsächlich im Zervixgewebe vorkommt, wurden für jede Variante spezifische Primer entworfen. Diese Primer lagen in dem Bereich, der für die jeweilige Variante einzigartig ist. Über das Onlineportal Primer-BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) wurde außerdem geprüft, dass die Primer kein anderes Produkt in ähnlicher Größe erzeugen. Die verwendeten Primer sind im Anhang zu finden (siehe 7.2). Zur Unterscheidung der Varianten ZNF671-001 und -201 wurde ein Primerpaar entworfen, welches ein Produkt amplifiziert, in dem der entscheidende Mismatch liegt und anschließend wurde das PCR-Produkt

Ergebnisse

sequenziert. Dabei musste festgestellt werden, dass die Variante ZNF671-201 nicht ein einziges Mal amplifiziert wurde, weder in einer Zelllinie, noch in einer Gewebeentität der Zervix (Normalgewebe, CIN3, CxCa). Die Variante 201 konnte somit nicht nachgewiesen werden. Es könnte gemutmaßt werden, dass diese Variante in der Natur gar nicht vorkommt, sondern eventuell durch einen Sequenzierfehler Einzug in die Datenbanken gehalten hat. Die Verteilung der Transkriptvarianten in den Zervixkarzinomzelllinien (siehe Abbildung 25) und in den Geweben (siehe Abbildung 26) ist im Nachfolgenden dargestellt.

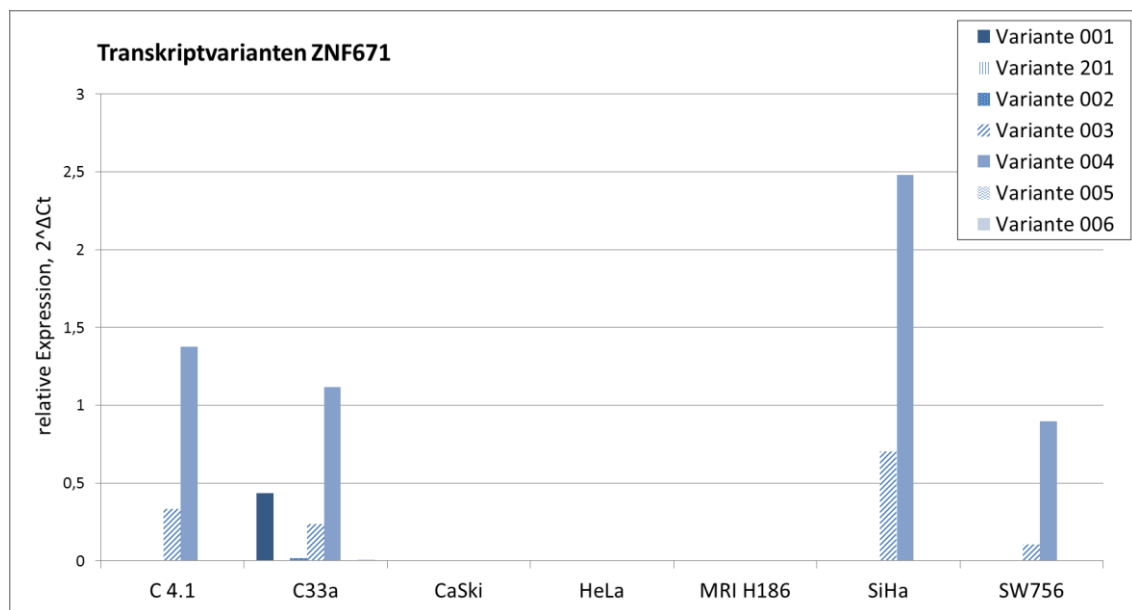


Abbildung 25 – Relative Expression der verschiedenen Transkriptvarianten von ZNF671 in CxCa-Zelllinien, Expression ist relativ zu HPRT aufgetragen

Die Verteilung in den Zervixkarzinomzelllinien bestätigt die ersten Expressionsanalysen in denen die Variante ZNF671-001 untersucht wurde. Diese ist in Zervixkarzinomzellen schwach exprimiert. Die Varianten ZNF671-003 (protein kodierend) und -004 (nonsense) sind dagegen zum Teil sehr stark vertreten. Auf die Wirkung des Proteins ZNF671 hat die Variante 004 aber keinen Einfluss, da diese laut Datenbank abgebaut wird und daraus kein Protein entsteht.

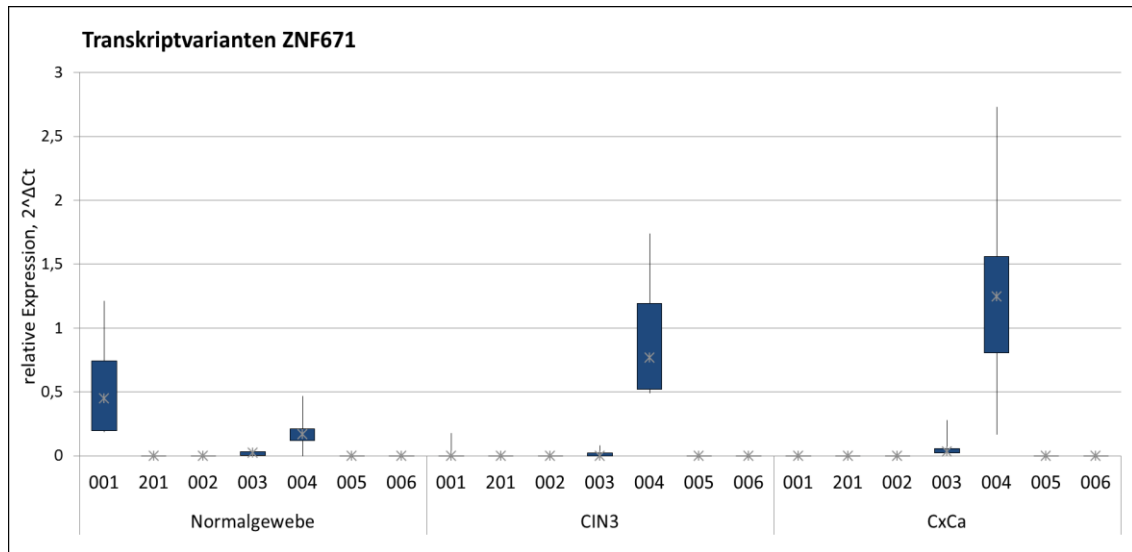


Abbildung 26 – Relative Expression der verschiedenen Transkriptvarianten von ZNF671 in Geweben, Expression ist relativ zu HPRT aufgetragen

Die Untersuchung der verschiedenen Transkriptvarianten in RNA aus Gesamtgewebeproben zeigt für die Hauptvariante ZNF671-001 analoge Ergebnisse wie die ersten Expressionsuntersuchungen an Zervixmaterial. Im Normalgewebe ist die RNA noch nachweisbar, wohingegen sie in CIN3- und CxCa-Geweben nahezu verschwindet. Demgegenüber kann man die nonsense-Variante 004 verstärkt in den dysplastischen Zellen nachweisen. Die Produkte wurden auch über eine Sequenzierung bestätigt. Die dritte proteinkodierende Variante ZNF671-003 bleibt auf einem gleichbleibend niedrigen Niveau. Man kann durch diese Schlussfolgerungen davon ausgehen, dass die Variante ZNF671-001 jene ist, die für das funktionstüchtige Protein verantwortlich ist. Dies wird auf Onlineportalen, wie Ensembl auch so postuliert.

4.4 Umklonierung ZNF671

Für genauere funktionelle Untersuchungen an Zervixkarzinomzellkulturen, in denen ZNF671 wieder hoch exprimiert vorliegt, wurde ein cDNA-Klon mit der jeweiligen kompletten cds-Sequenz im Vektor pCMV-SPORT6 bei der Firma Life Sciences bestellt (ZNF671 IMAGE ID 5202908/IRAT42 D12). Bei der genaueren Untersuchung des cDNA-Klons wurde festgestellt, dass dieser dem Protein ZNF671-201 entspricht. Da diese Variante in der Zervix allerdings nicht nachzuweisen war (siehe 4.3.2), kann davon ausgegangen werden, dass sie nach dem Wiedereinbringen in Zervixkarzinomzelllinien

Ergebnisse

nicht zum erwünschten Effekt führt. Somit wurde ein neuer Reverse-Primer entworfen, welcher an der entsprechenden Stelle einen Mismatch zum Klon besitzt und damit der Variante ZNF671-001 entspricht. Nach der erfolgreichen Long-Expand-PCR mit diesem Primer und dem Forward-Primer ab Startcodon konnte nun das richtige Fragment für ZNF671-001 in die Zelllinien transduziert werden. Nach der Klonierung und Anzucht positiver Klone erfolgte zur Kontrolle ein Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen NotI und NheI, welche kurz vor und hinter dem Insert schneiden, wodurch das PCR-Produkt (1622 bp) aus dem Vektor mit einer Größe 7384 bp herausfällt. Dies konnte in der Gelelektrophorese gezeigt werden (Abbildung 27).

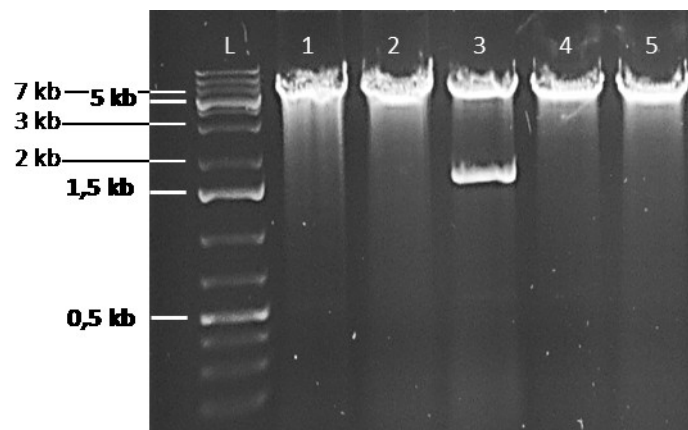


Abbildung 27 – Restriktionsverdau zur Kontrolle der Umklonierung, nur Klon 3 wurde durch die Restriktionsendonukleasen geschnitten, sodass das Fragment (1622 bp) heraus fällt, L \triangleq 1kb Plus DNA Ladder

Der positive Klon 3 wurde anschließend komplett sequenziert (SeqLab). Als Ergebnis erhielt man die Basenabfolge, die zu 100% identisch ist mit der Sequenz von ZNF671-001 (Start- bis Stoppcodon). Das Ergebnis der Sequenzierung ist im Anhang unter 7.3 dargestellt.

4.5 Lentivirale Transduktion ZNF671

Lentiviren sind in der Lage, eukaryotische Zellen zu infizieren und nach der Infektion einer Zelle deren Synthesemaschinerie zu veranlassen, ihr genetisches Material zu produzieren. Somit stellen sie besonders gut geeignete Vektoren für den Gentransfer dar. Lentivirale Vektoren sind im Stande ruhende oder nur langsam teilende Zellen zu infizieren und ihr genetisches Material in das Genom der Zielzelle zu integrieren. Dies

Ergebnisse

führt zu einer stabilen Expression des Zielgens in den infizierten Zellen und deren Tochterzellen [93]. Um das potentielle Tumorsuppressorgen ZNF671 wieder stabil in den beiden Zervixkarzinomzelllinien HeLa und CaSki, in denen es reprimiert vorliegt, zu exprimieren, wurden Lentiviren als Genfähre genutzt. Dazu wurde zunächst die Verpackungszelllinie HEK293T verwendet um Lentiviren mit dem entsprechenden ZNF671-Konstrukt herzustellen, welche wiederum auf die ausgewählten Zielzellen gegeben wurden. Nach erfolgreicher Transduktion wurden die Zellen weiter kultiviert und selektioniert. Im Anschluss an die Selektion wurden verschiedene Funktionsassays durchgeführt.

4.5.1 Virenbildung der HEK293T-Zellen

Die Transfektion der Virus-produzierenden humanen Nierenzellen HEK293T erfolgte mit dem Lipofectamine® 2000-Reagenz und den entsprechenden Verpackungsplasmiden (siehe Tabelle 2). Die somit infizierten HEK293T-Zellen wurden zur optimalen Virusproduktion bei 35°C und 3% CO₂ für 48, bzw. 72 Stunden kultiviert. Zur Beurteilung der Virusproduktion wurde auf eine Kultur das Plasmid für das Grün-Fluoreszierenden-Protein (GFP-pCDH) gegeben. Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann nach entsprechender Anregung festgestellt werden, ob die Infektion erfolgreich war und Viren gebildet wurden. Man sieht somit grün fluoreszierende synzytiale Zellen, die auch deutlich größer als die nicht Virus-produzierenden Zellen und kreisrund sind (siehe Abbildung 28).



Abbildung 28 – HEK293T-Zellen 72 h nach Lipofectamine® 2000-Transfektion mit den Verpackungsplasmiden und GFP-pCDH

- a) Hellfeld-Aufnahme, die synzytialen, großen runden Zellen produzieren den Virus
- b) Fluoreszenz- und Durchlicht-Aufnahme
- c) Fluoreszenz-Aufnahme, die grün-leuchtenden Zellen exprimieren GFP, die großen synzytialen Zellen produzieren den Virus

4.5.2 Transduktion der Zervixkarzinomzelllinien

Nach der Ernte der im Überstand befindlichen Lentiviren erfolgte die Transduktion der Zielzellen – in diesem Falle HeLa- und CaSki-Zellen. Hierfür wurde ebenfalls als Kontrolle der Virusüberstand der GFP-pCDH produzierenden Zellen auf jeweils eine HeLa- und eine CaSki-Kultur gegeben. Drei Tage nach der Transduktion waren grün-fluoreszierende Zellen auszumachen. Für CaSki war die Transfektionseffizienz deutlich höher als für HeLa (siehe Abbildung 29).

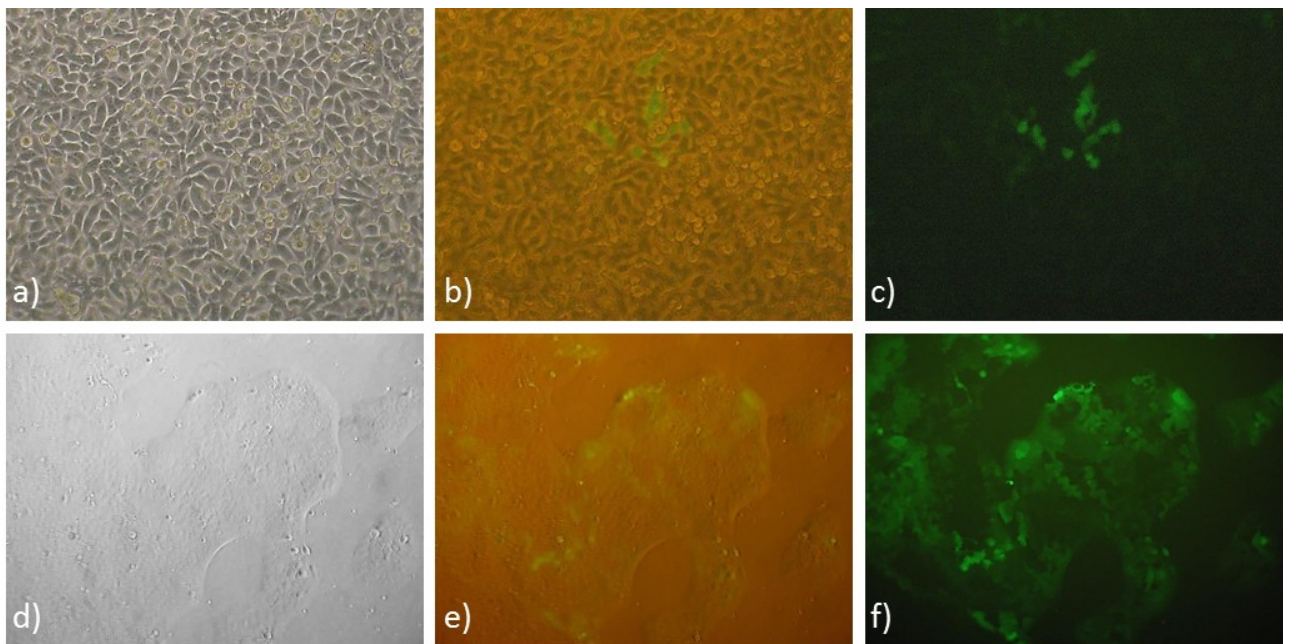


Abbildung 29 – HeLa (a-c) und CaSki-Zellen (d-f), drei Tage nach Transduktion mit den geernteten GFP-pCDH enthaltenen Viren

- a + d) Hellfeld-Aufnahmen
- b + e) Fluoreszenz- und Durchlicht-Aufnahmen
- c + f) Fluoreszenz-Aufnahmen

Ergebnisse

Nach ausreichender Vermehrung der Zellen wurde RNA isoliert und die ZNF671-Expression überprüft. Um zu gewährleisten, dass bei längerer Kultivierung die nicht transduzierten die erfolgreich transduzierten Zellen nicht überwachsen, wurde eine Puromycin-Selektion durchgeführt. Durch einen Zytotoxizitätstest wurde dabei für beide Zervixkarzinomzelllinien eine toxische Puromycinkonzentration von 0,5 µg/ml festgestellt. Nach einer einwöchigen Selektion unter diesen Bedingungen wurde abermals RNA geerntet, um die Expression zu kontrollieren. Als Positivkontrolle wurde cDNA aus C33a- und SK-OV-03-Zellen mitgeführt. Wie in Abbildung 30 zu sehen, war die Expression für beide Zelllinien sehr erfolgreich. Besonders nach Selektion konnte eine erhöhte ZNF671-Expression gemessen werden. Diese war sogar um über ein zehnfaches höher als bei den als Positivkontrollen genutzten Zelllinien, in denen durch vorangegangene Analysen eine hohe Expression festgestellt wurde (nicht gezeigt).

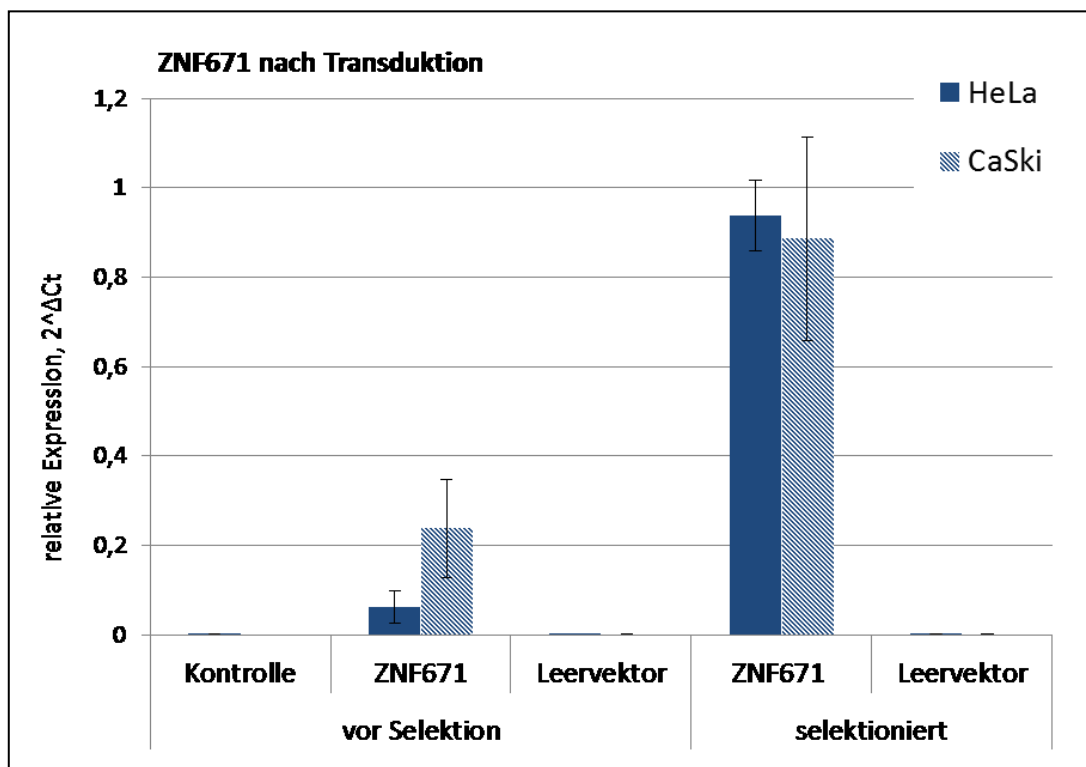


Abbildung 30 – Relative Expression von ZNF671 nach Transduktion der HeLa- und CaSki-Zellen
 Kontrolle \triangle Zellen unter Standardbedingungen
 ZNF671 \triangle Transduktion mit ZNF671-pCDH
 Leervektor \triangle Transduktion mit pCDH, Expression ist relativ zu HPRT aufgetragen

4.5.3 Überprüfung des Proteins ZNF671

Um zu überprüfen, ob die gemessene Hochexpression des Genes nach Transduktion auch in einer messbar höheren Proteinkonzentration resultiert, wurden aus den Zellextrakten Proteine isoliert. Mittels des verwendeten Kits (NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents) konnte hierbei eine Extrahierung der Proteine separat für das Cytoplasma (\triangleq cytoplasmatischer Extrakt) und den Zellkern (\triangleq nukleärer Extrakt) erfolgen. In Abbildung 31 ist zu sehen, dass für den nukleären Proteinextrakt aus den transduzierten HeLa- und auch CaSki-Zellen eine Bande auf der entsprechenden Höhe (60 kDa) entstanden ist. Somit konnte der Proteinnachweis für diese beiden Proben erbracht werden. Demgegenüber wurde aus dem cytoplasmatischen Extrakt das Protein nur zu einem sehr geringen Anteil für HeLa bestätigt. Im Extrakt aus den Kontrollzellen von HeLa und CaSki und den mit dem Leervektor transduzierten Zellen wurde kein Protein nachgewiesen.

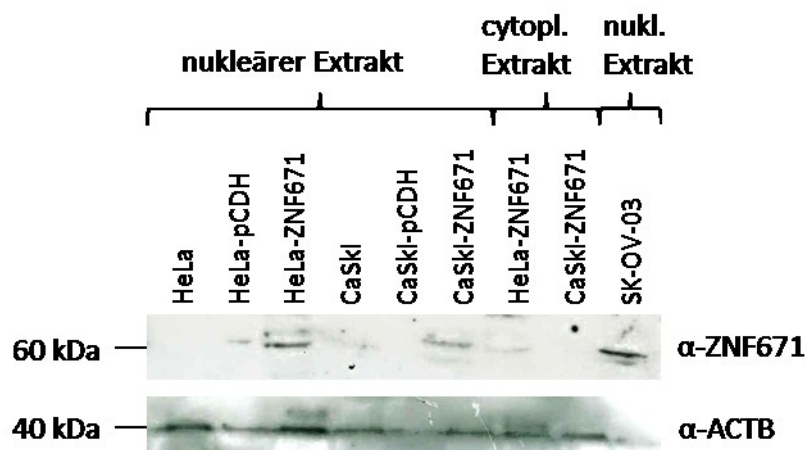


Abbildung 31 – Western Blot des Proteinextrakts der transduzierten Zellen (mit dem Leervektor pCDH bzw. mit ZNF671 transduziert) und den Kontrollzellen der jeweiligen Zelllinie, SK-OV-03 wurde als Positivkontrolle mitgeführt

4.6 *in vitro* Funktionsassays ZNF671

Die nun neu generierten stabil ZNF671 exprimierenden Zervixkarzinomzellkulturen HeLa-ZNF671 und CaSki-ZNF671 eignen sich, um *in vitro* Funktionsassays durchzuführen. Bestimmte Wachstums- und Stoffwechselprozesse können in An- und Abwesenheit des potentiellen Tumorsuppressorgens ZNF671 untersucht werden, um

Ergebnisse

Hinweise zu erhalten, ob die Hypermethylierung von ZNF671 während der Zervixkarzinogenese und die daraus resultierende Stilllegung des Gens eine Rolle spielen. Verglichen wurden bei allen Funktionsassays das Verhalten in Anwesenheit von ZNF671 und in Anwesenheit des Leervektors. Normalisiert wurden diese beiden Werte immer auf die Ursprungszelllinie, die unter Standardbedingungen kultiviert und nicht transduziert wurde.

4.6.1 Kolonieformierungsassay

Um die Kontakt-unabhängige Zellproliferation nach Transduktion mit ZNF671 zu überprüfen wurden Zellen in einer niedrigen Konzentration (1000 Zellen für HeLa, 5000 Zellen für CaSki) in einer 6-Well Platte ausgesät, sodass kein Wachstum in einer adhärennten Zellschicht möglich war. Stattdessen bilden die Zellen bei diesem Versuch Kolonien, die nach fünf bis sieben Tagen (je nach Zelllinie) fixiert, mit Kristallviolett gefärbt und ausgezählt werden konnten. Beispielhaft ist in der nachfolgenden Abbildung 32 das Ergebnis eines Versuches dargestellt. Insgesamt wurde der Versuch dreimal jeweils im Duplexansatz durchgeführt.

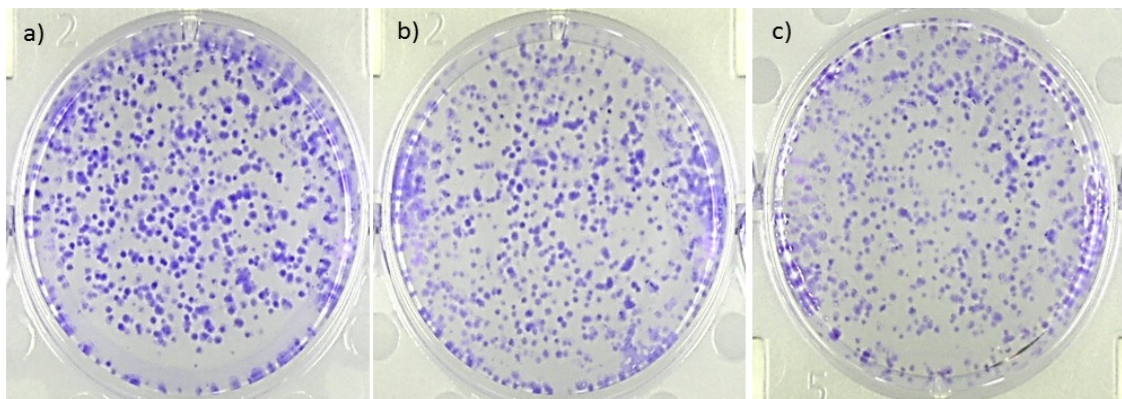


Abbildung 32 – Kolonieformierungsassay HeLa, 5 Tage nach Aussaat von 1000 Zellen/well, Färbung mit Kristallviolett

- a) HeLa-Kontrolle
- b) HeLa-Leervektor
- c) HeLa-ZNF671

Auf dem ersten Blick ist kein deutlicher Unterschied zu erkennen. Die Koloniezahlen nach Auszählung sind in nachfolgender Tabelle 17 dargestellt. Alle sechs Ergebnisse wurden nun normalisiert auf die Standardzelllinie und der jeweilige Mittelwert ist im Punktdiagramm in Abbildung 33 zu sehen.

Ergebnisse

Tabelle 17 – Anzahl der angefärbten Kolonien

Versuch	HeLa			CaSki		
	Kontrolle	Leervektor	ZNF671	Kontrolle	Leervektor	ZNF671
1	665	547	598	492	526	342
2	560	566	584	429	457	513
3	657	503	515	426	305	385
4	594	494	403	470	306	311
5	528	591	385	343	537	348
6	649	436	490	449	544	552

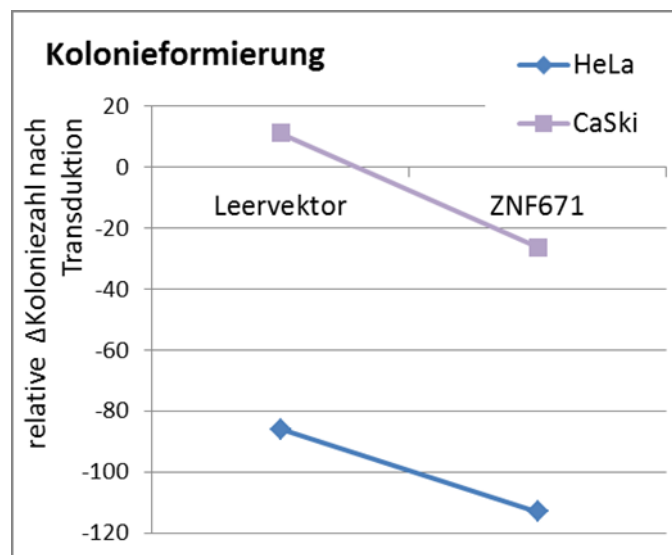


Abbildung 33 – Ergebnis des Kolonieformierungsassays, aufgetragen ist die relative Anzahl der Kolonien für die mit dem Leervektor und ZNF671 transduzierten Zellen, Koloniezahl ist relativ zur Koloniezahl der Standardzellkultur aufgetragen

Im Punktdiagramm ist ein Unterschied für beide Zelllinien zwischen dem mit dem Leervektor transduzierten und den ZNF671 hoch exprimierenden Kulturen zu erkennen. Dieser Unterschied ist aber mit durchschnittlich 30-40 Kolonien gering. Die Unterschiede in der Koloniezahl zwischen den Gruppen sind nicht signifikant.

4.6.2 Proliferationsassay

Im Proliferationsassay erfolgte die Analyse der proliferativen Kapazität der Zellen nach der Transduktion. Dazu wurde die metabolische Aktivität einer genau definiert ausgesäten Zellzahl nach 24, 48 sowie 72 Stunden mittels MTT-Assay bestimmt. Die

Ergebnisse

metabolische Aktivität wurde normalisiert auf den MTT-Umsatz drei Stunden nach Zellaussaat um Fehler bei der Einstellung der Zellzahl auszuschließen. Der Versuch wurde dreimal und für jede Kultur im Triplikat ausgeführt. Die Mittelwerte aller neun Messpunkte sind im Diagramm (Abbildung 34) dargestellt.

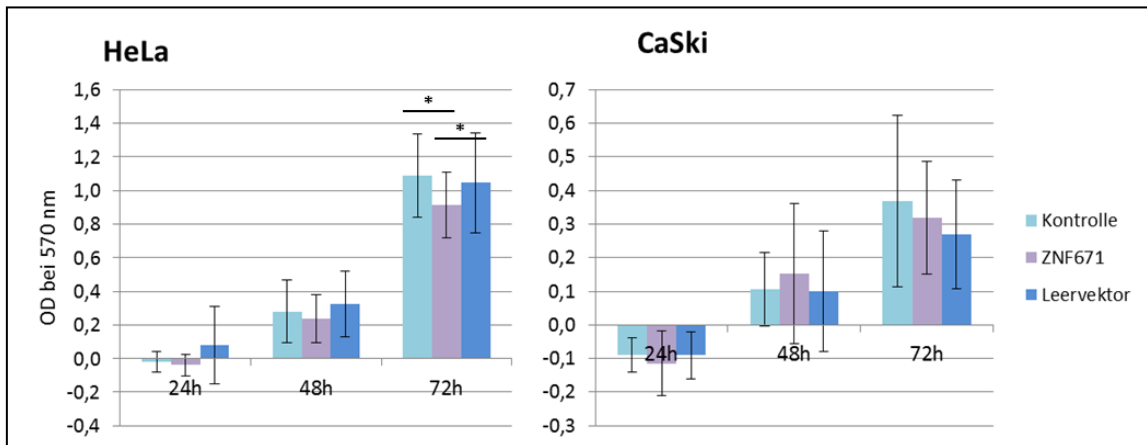


Abbildung 34 – Ergebnis des MTT-Proliferationsassays, aufgetragen ist die Optische Dichte (OD) bei 570 nm normalisiert auf den MTT-Umsatz nach 3 h, Mittelwerte der neun Versuchsergebnisse sind als Balken dargestellt mit den jeweiligen Standardabweichungen

Die verringerte proliferative Aktivität von ZNF671 in der das Protein hoch exprimierenden Zervixkarzinomzelllinie HeLa, im Vergleich zur Kontrolle unter Standardbedingungen und dem Leervektor war nach 72 Stunden signifikant. In der Zelllinie CaSki wurde dieser Effekt nicht festgestellt.

4.6.3 Invasions- und Migrationsassay

Ein Charakteristikum von Tumorzellen ist das invasive Wachstum, das es ihnen ermöglicht aus dem Zellverband auszubrechen und sich über die Gefäße in andere Gewebe auszubreiten und Metastasen zu bilden [94]. Im folgenden Assay wurde dieses Migrations- und Invasionsverhalten untersucht. Die beiden Zervixkarzinomzelllinien HeLa und CaSki sind grundsätzlich in der Lage invasiv zu wachsen. Es sollte nun überprüft werden, ob diese Eigenschaft durch Einbringen des potentiellen Tumorsuppressorgens ZNF671 beeinflusst wird. Dazu erfolgte das Wachstum in speziellen Inserts, die für den Invasionstest noch zusätzlich mit Matrigel beschichtet wurden. Nach der Durchführung wurden die Zellen wieder fixiert und mit einer 0,1%igen Kristallviolett-Lösung gefärbt. Danach konnten die Wells mikroskopisch

Ergebnisse

begutachtet, sowie entfärbt und das Konzentrat vermessen werden. Der Wert der Optischen Dichte wurde auf die Kontrollzellkultur normalisiert. In Abbildung 35 ist das Ergebnis der Migrationsversuche mikroskopisch für HeLa und grafisch für beide untersuchten Zelllinien dargestellt.

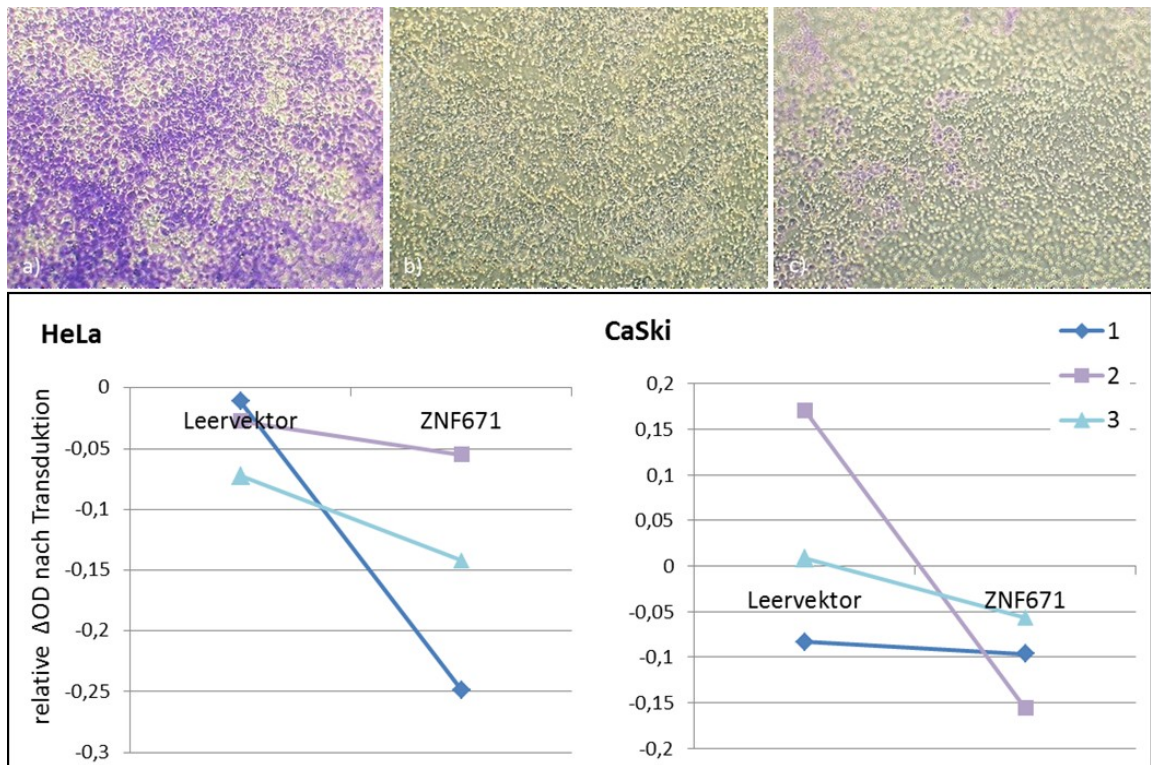


Abbildung 35 – oben: a-c) mikroskopische Aufnahme des Migrationsverhaltens der HeLa-Zellen nach 24 h und anschließender Fixierung und Kristallviolett-Färbung, a) Kontrollzellen HeLa, b) HeLa-ZNF671, c) HeLa-Leervektor unten: grafische Darstellung der drei Migrationsexperimente, Darstellung der relativen Optischen Dichte (OD) bei 630 nm für die mit dem Leervektor und ZNF671 transduzierten Zellen, OD ist relativ zum OD der Standardzellkultur aufgetragen

Man erkennt deutlich in a), dass viele Zellen der Krebszelllinien HeLa in der Lage sind durch das Matrigel zum Ort des höheren Nährstoffgehalts zu migrieren. Diese Eigenschaft scheint durch die Transduktion per se schon beeinflusst zu werden. So sieht man nach Transduktion mit dem Leervektor in c), dass deutlich weniger Zellen dazu in der Lage waren und nach Transduktion mit ZNF671 b) waren sogar nur vereinzelt migrierte Zellen zu finden. Dieser Trend konnte in allen drei Versuchen gezeigt werden, jedoch für Versuch 1 am deutlichsten. Die mikroskopischen Aufnahmen stammen aus diesem Versuch. Die Ergebnisse zur Untersuchung der Invasion sind in Abbildung 36 abgebildet.

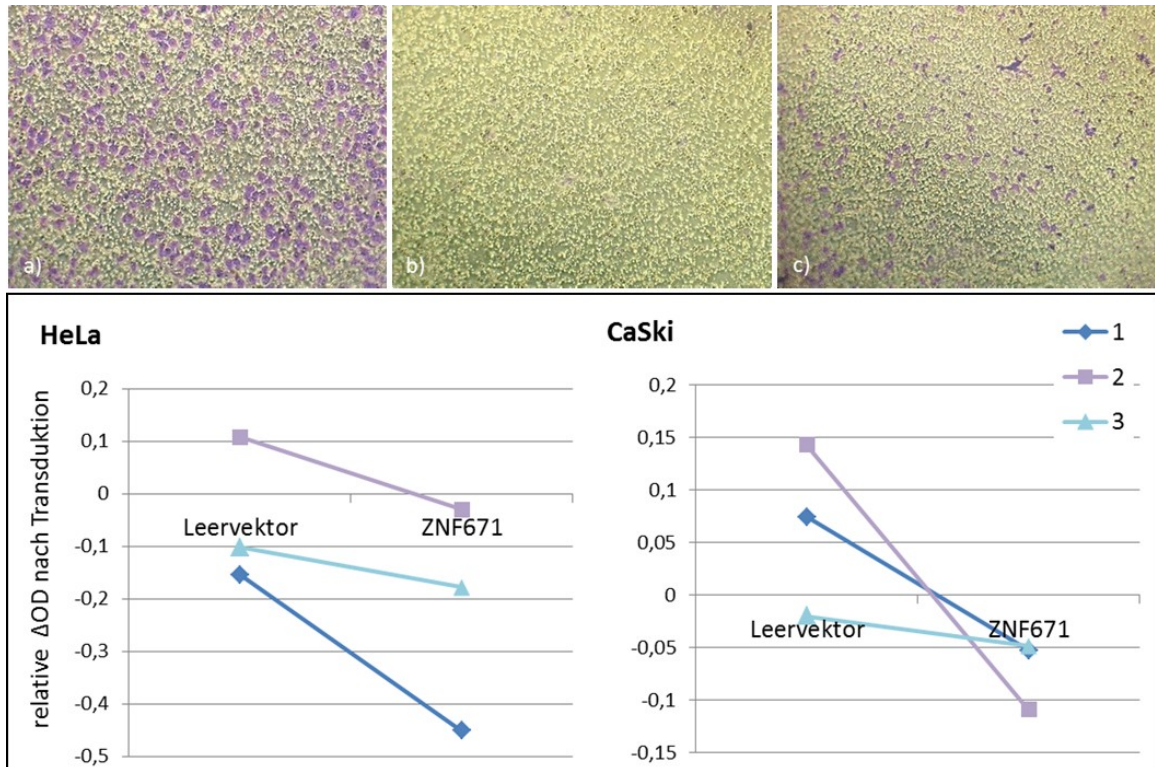


Abbildung 36 – oben: a-c) mikroskopische Aufnahme des Invasionsverhaltens der HeLa-Zellen nach 24 h und anschließender Fixierung und Kristallviolett-färbung, a) Kontrollzellen HeLa, b) HeLa-ZNF671, c) HeLa-Leervektor unten: grafische Darstellung der drei Invasionsexperimente, Darstellung der relativen Optischen Dichte (OD) bei 630 nm für die mit dem Leervektor und ZNF671 transduzierten Zellen, OD ist relativ zum OD der Standardzellkultur aufgetragen

Die Ergebnisse des Invasionsassays sind analog zu denen des Migrationsassays zu sehen. Auch hier ist die Fähigkeit der Zellen zu invadieren durch die Transduktion mit dem Leervektor beeinflusst, bei den ZNF671 transduzierten Zellen ist diese Fähigkeit aber nochmals herabgesetzt. Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen ist für die Krebszelllinie CaSki statistisch signifikant ($p = 0,013$).

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Fähigkeit der Invasion, als auch Migration der ZNF671 exprimierenden Zellen herabgesetzt ist.

5 Diskussion

5.1 Expressions-und Methylierungsuntersuchungen

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand zunächst darin zu untersuchen, inwiefern eine Hypermethylierung in der Promoterregion von Genen, welche in Abstrichen des Muttermundes aus Patientinnen mit Zervixkarzinom oder einer Vorstufe vermehrt gefunden wurde, einen Einfluss auf die Expression der jeweiligen Gene hat. Erstmals im Jahr 1975 publiziert, ist bekannt dass Methylierung einen Einfluss auf die Genexpression haben kann [95]. Ebenso kann eine Promotor-Hypermethylierung aber auch nur einen sehr geringen bis keinen Einfluss auf die Expression haben. Nach der Two Hit-Hypothese der Tumorgenese von Knudson müssen beide Allele eines Tumorsuppressorgens verändert sein, um dessen Expression zu unterdrücken, seine Funktion auszuschalten und somit den Krebs zu initiieren [96]. Da die hier zugrunde liegenden Methylierungsassays jedoch nicht zwischen den beiden Allelen eines Chromosomensatzes unterscheiden, kann man nicht kurzerhand von einer Hypermethylierung auf die Reprimierung des Gens schließen. Von daher war es für die Suche nach einem potentiellen Tumorsuppressorgen nötig die Genexpression direkt zu untersuchen.

Nach verschiedenen Analysen mit den unterschiedlichsten Probensets konnte mit ZNF671 ein Gen gefunden werden, für das ein statistisch signifikanter negativer Zusammenhang zwischen Methylierung der Markerregion und Expression des Gens gezeigt werden konnte. Auch in den sich anschließenden *in vitro* Funktionsassays bestätigte sich die Hypothese, dass ZNF671 während der Zervixkarzinogenese kausal hypermethyliert wird und somit einen entscheidenden Schritt bei der Tumorentstehung darstellen könnte.

5.1.1 Zellkulturproben

In den ersten Analysen an Probenmaterial aus der Zellkultur zur Untersuchung des Einflusses der Promotormethylierung auf die Genexpression der Marker zeigte sich für über 70% der Marker die von Holliday und Pugh beschriebene negative Korrelation der beiden Größen. Nur für vier Marker wurde diese Relation nicht beobachtet. Für einen Marker war sogar ein positiver Zusammenhang zu erkennen, das heißt, es wurde in

Diskussion

den Zelllinien sowohl eine Hypermethylierung, als auch eine starke Expression gemessen. Dies scheint nicht ungewöhnlich, da in der Literatur Gene zu finden sind, die eine starke Expression trotz tumorassoziierter Hypermethylierung des Promotorbereiches aufweisen [97]. Grund dafür ist, dass Methylierung nicht der einzige Mechanismus zur Expressionsregulation sein kann. Eine Expressionssteigerung kann neben einer Demethylierung auch durch Mutationen, Translokationen oder DNA-Zugewinn ausgelöst werden, wobei dann auch ein betroffenes Allel ausreicht. Nichtsdestotrotz ist Promotor-Hypermethylierung eine der am besten untersuchten Veränderungen im Tumorgeschehen und ist praktisch in jeder Tumorentität im Zusammenhang mit der Gen-Stillegung gefunden wurden [98, 99]. So konnte auch in den vorliegenden Untersuchungen eine signifikant negative Korrelation zwischen Methylierung und Expression für vier Gene (DLX1, EDIL3, NXP1 und ZNF671) gezeigt werden.

Durch Gegenüberstellung der Zervixkarzinomzelllinien und der humanen mit HPV-16 und -18 transduzierten primären Keratinozyten war zu ermitteln, ob allein die Anwesenheit des Virus den Methylierungs- und Expressionsgrad beeinflusst. Abgesehen davon, dass es sich um grundsätzlich unterschiedliche Zelltypen handelt, ist dies nicht der Fall. Alle untersuchten Genregionen zeigen eine stärkere Methylierung in den Zelllinien, die aus einem Zervixkarzinom hervorgehen. Nunmehr besteht ein deutlicher Hinweis darauf, dass die HPV-Infektion nicht primär das Methylierungslevel beeinflusst. Dies steht im Gegensatz zu einigen Untersuchungen, bei welchen beispielsweise die Abwesenheit der RASSF1A-Promotor-Methylierung (Ras association domain family 1 isoform, Tumorsuppressorgen) im Zervixkarzinom mit einem erhöhten Level von HPV-DNA einhergeht [100]. Höchstwahrscheinlich liegt es daran, dass die hier untersuchten Gene keinen Einfluss auf den HPV-Lebenszyklus haben und somit nicht im Zuge der Transformation hypermethyliert werden. Vielmehr erfolgt die Methylierung im Zusammenhang eines anderen Karzinogenesemechanismus (60% der Gene zeigten eine erniedrigte Expression in den methylierten CxCa-Zelllinien) bzw. tumorbegleitend, ist aber nicht kausal am Tumorgeschehen beteiligt (40% der Gene zeigten keine Reprimierung).

In der Therapie einiger Krankheiten wird 5-Aza-2'-Deoxycytidin getestet als demethylierender Wirkstoff zur Reaktivierung der Genexpression (Garcia-Manero und

Gore 2005). Beim Myelodysplastischem Syndrom (MDS)- und Leukämie-Patienten ist es sogar als Chemotherapeutikum zugelassen [101, 102]. Im Gegensatz zu den vorausgegangenen Untersuchungen lieferte die Behandlung der Zervixkarzinomzellkulturen mit dieser Substanz ein eher unbefriedigendes Ergebnis. Die von Jones und Taylor 1980 erstmals beschriebene Methode mittels Behandlung der Zellen mit 5-Aza-CdR eine Methylierungsinhibierung herzustellen [103], erwies sich als problematisch und schwer durchführbar. Der Grund hierfür liegt darin, dass durch das Agens nicht ein bestimmter Bereich des Genoms hypomethyliert wird, sondern, dass dies global geschieht. Dadurch sind auch wichtige Strukturproteine betroffen oder solche, die die Versorgung der Zelle sichern. Als Resultat erhält man unter der Behandlung eine Kultur, die sich morphologisch stark verändert und nicht mehr vital wirkt. Die Zellen lösen sich leicht vom Untergrund ab und besitzen auch nicht mehr den für Krebszelllinien typischen adhärenenten Zusammenhalt. Als Grundlage der Zellkultur-Untersuchungen dient allerdings eine auf die einzelne Zelle erhöhte 5-Aza-CdR-Konzentration, die um ein Vielfaches höher liegt als die pharmakologische. Außerdem ist bekannt, dass 5-Aza-CdR in der DNA zu Doppelstrangbrüchen oder Mutationen führen kann. Dessen Aktivierung durch Nukleosidtriphosphate und Einbau in DNA und RNA stört in der Zelle die Synthese von DNA, RNA und Proteinen [104]. Der Einbau von 5-Aza-CdR in die tRNA inhibiert die tRNA-Methyltransferasen [105] und beeinträchtigt deren Funktion, was zu fehlerhaften Akzeptorfunktionen der transfer-RNAs führt [106]. Da Methylierung auch eine wichtige Rolle bei der ribosomalen RNA-Verarbeitung spielt [107, 108], haben diese Effekte des 5-Aza-CdR Einbaus in die RNA auch eine Auswirkung auf die Proteinsynthese. Durch all diese Mechanismen wird die Qualität der RNA und DNA so stark beeinträchtigt, dass zwar messbar Nukleinsäuren isoliert wurden, diese aber scheinbar stark fragmentiert sind und somit in der anschließenden RT-PCR, bzw. qMSP keine ausreichende Amplifikation erfolgen konnte. Dies erklärt auch den Umstand, dass nicht für alle Gene einheitlich eine Demethylierung, geschweige denn eine Repression messbar war. Für das interessanteste Kandidatengen ZNF671 war dies noch am besten möglich und hier konnte sogar eine signifikante Herabregulation der Expression unter einer 5-Aza-CdR-Behandlung gezeigt werden.

5.1.2 Gewebeproben

Bei der Untersuchung von Gewebematerial wurde zunächst auf ein größeres Probenset bestehend aus gut charakterisierten klinischen Gewebeproben aus der Tumorbank der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe Jena zurückgegriffen. Mittels HE-Färbung konnte nochmals die Histologie begutachtet und so die Einteilung in eine der drei untersuchten Entitäten überprüft werden. Die drei zur Untersuchung relevanten Gruppen bestehen aus:

- Normalgewebe → Proben von HPV-positiven Patientinnen ohne histologischen Hinweis auf eine Neoplasie
- CIN3 → Proben von HPV-positiven Patientinnen mit histologisch nachgewiesener CIN3
- CxCa → Proben von HPV-positiven Patientinnen mit histologisch nachgewiesenem Zervixkarzinom

Ist die Rede von Gesamtgewebeproben, so wurden die Nukleinsäuren aus dem kompletten Gewebeschnitt isoliert. Anders als in den Versuchen mit mikrodisektiertem Material fließt in diese Untersuchungen auch DNA und RNA aus dem den Epithel- oder Tumorgewebe umliegenden Gewebe mit ein, wie beispielsweise aus dem Stroma. Dadurch kommt es eventuell zu einer Verzerrung des Methylierungs- und Expressionsprofils. Außerdem hatte dies zur Folge, dass die Qualität der RNA oftmals nicht ausreichte, um eine gute Amplifikation in der PCR zu erbringen, was sich wiederum in hohen Ct-Werten der Housekeeping-Gene äußerte. Solche Proben mussten dann aus der Auswertung ausgeschlossen werden. War mit dem jeweiligen Markergen aber dennoch ein Ct-Wert messbar, so wurde die Probe bei der Auswertung wieder berücksichtigt. Dies führt nun dazu, dass z.T. unterschiedliche Größen in den drei zervikalen Probengruppen vorlagen, was die Auswertung mitunter erschwerte. Trotz des Umstands konnte man für acht von neun untersuchten Markergenen eine Hypermethylierung während der Tumorgenese beobachten. Für drei Gene (NXPH1, PCDHGB3 und ZNF671) sank auch gleichzeitig die Expression. Bei Untersuchungen des mikrodisektierten Materials konnte solch eine negative

Korrelation für alle vier untersuchten Gene (ASTN1, NXPH1, SOX17 und ZNF671) ermittelt werden. Für ZNF671 ist dieser Zusammenhang ebenfalls signifikant.

5.2 ZNF671

Resümierend ist festzustellen, dass in allen Untersuchungen hinsichtlich des Zusammenhangs von Methylierung und Expression das Gen ZNF671 eine deutlich negative Korrelation gezeigt hat. Somit zeigt es das klassische Bild eines Tumorsuppressorgens, das durch Promotor-Hypermethylierung inaktiviert wird und folglich mit der Pathogenese und Progression von Gebärmutterhalskrebs gekoppelt ist [109].

5.2.1 Lokalisation

Um genau zu lokalisieren in welchen Epithelschichten das „gene of interest“ (GOI) – in diesem Fall ZNF671 als Tumorsuppressorgen – tatsächlich exprimiert wird, wurde die Methode der RNA-RNA *in situ* Hybridisierung gewählt. Tatsächlich konnte man im direkten Vergleich der antisense Sonde (jene, die komplementär zur mRNA-Sequenz des GOIs ist und somit binden sollte) mit der sense Sonde (jene die identisch mit der mRNA-Sequenz des GOIs ist und somit nicht binden sollte) in den normalen Epithelgeweben besonders der basalen und parabasalen Schichten eine Färbung mit der antisense Sonde erkennen. Das Plattenepithel weist strukturelle und funktionelle Unterschiede in den Epithelzellen der apikalen (dem Äußeren bzw. dem Lumen zugewandte Seite) und basalen (Seite, die über eine Basallamina mit dem darunterliegenden Gewebe verbunden ist) Membran auf. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einer apikalen und basolateralen Domäne. In letzterer wurde die Expression von ZNF671 gefunden. Sie zeichnet sich durch das Vorhandensein von Zelladhäsionsmolekülen und Zellverbindungen (cell junctions) aus. Die Zelladhäsionsmoleküle sind diffus verteilt und dienen der Zellhaftung. Sie gehören meist zu Proteinfamilien mit zahlreichen z.T. zellspezifischen Untergruppen (z.B. Cadherine, Selektine, Immunglobuline, Integrine) [110].

Die Lokalisation des Proteins in der Zelle konnte ebenfalls untersucht werden. Proteinlysate wurden aus Zellpellets der laufenden Zellkultur unter Verwendung des NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents isoliert. Dabei lysiert man die

Zellen stufenweise und trennt die nukleäre und zytoplasmatische Proteinfraction durch Zentrifugationsschritte. Für die als Positivkontrolle dienende Zelllinie SK-OV-03, sowie für die mit ZNF671 transduzierten HeLa- und CaSki-Zellen konnte im Zellkernextrakt das Protein nachgewiesen werden. Demgegenüber war der Nachweis im zytoplasmatischen Extrakt für HeLa und SK-OV-03 (nicht gezeigt) deutlich schwächer, bzw. für CaSki nicht zu erbringen. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass ZNF671 als Mitglied der Zink-Finger-Protein Familie und somit Transkriptionsfaktor im Zellkern lokalisiert und an der Transkriptionsregulation beteiligt ist. Ein Modell, wie diese Progression hin zu einer zervikalen Neoplasie unter ZNF671-Promotor-Hypermethylierung aussehen kann ist in Abbildung 37 dargestellt.

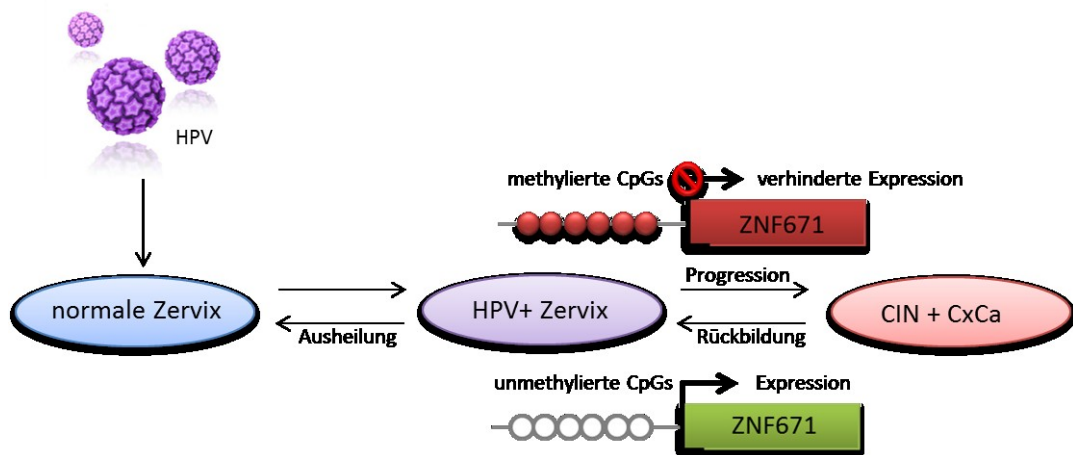


Abbildung 37 – schematische Darstellung der Progression zu einer CIN oder einem CxCa unter Promotor-Hypermethylierung von ZNF671

5.2.2 Funktionsassays

Durch die lentivirale Transduktion zweier Zervixkarzinomzelllinien war es möglich, das Verhalten der immortalisierten Zellen unter Wiederherstellung der ZNF671-Funktion zu untersuchen. Hierbei wurde Hauptaugenmerk auf die Fähigkeit zur Koloniebildung, Proliferation, Migration und Invasion gelegt, was alles Eigenschaften einer Krebszelle sind und zu den „Hallmarks of Cancer“ gehören [94]. Unter Wiedereinbringung des Proteins ZNF671 konnte weder die Fähigkeit der Zellen Kolonien zu bilden, noch zu proliferieren beeinflusst werden. Jedoch war eine Veränderung der Zellen in ihrem Migrations- und Invasionsverhalten erkennbar. Beide mobilen Prozesse sind unter dem Beisein von ZNF671 beeinträchtigt. Diese Fähigkeiten sind für eine Krebszelle von

entscheidender Bedeutung. Im Prozess der Metastasierung durchbricht die Krebszelle die Grenzen des Ursprungsorgans und dringt in benachbarte Gewebe ein, bzw. migriert über den Lymphweg in entferntere Organe. ZNF671 spielt in diesem Prozess allem Anschein nach eine bedeutende Rolle über seine Interaktionspartner (siehe 5.2.3).

Da der Prozess der Metastasierung erst relativ spät in der Karzinogenese von Bedeutung ist, könnte man mutmaßen, dass ZNF671 als ein Tumorsuppressorgen erst in einem weit fortgeschrittenen Stadium abgeschaltet wird. Man sah in den Expressionsuntersuchungen der mikrodisezierten Gewebe auch eine noch signifikante Verringerung der Expression vom CIN3- zum Zervixkarzinomstadium. Allerdings war auch ein Methylierungsanstieg vom Normalgewebe zum CIN3-Gewebe zu beobachten und in den RNA-RNA *in situ* Hybridisierungen war keine ZNF671-Expression in einem CIN3-Stadium zu finden. Schlussfolgernd ist die Hypermethylierung von ZNF671 ein längerer Prozess, der recht früh in der Zervixkarzinogenese beginnt.

5.2.3 Interaktionspartner

Verschiedene Signaltransduktionsstudien weisen darauf hin, dass bekannte zelluläre Signalwege nur ein Teil viel größerer molekularer Interaktionsnetzwerke sind [111-113]. So können beispielsweise die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) über extrazelluläre Signalkinasen (ERKs) Prozesse wie Differenzierung, Proliferation, Überleben und Migration beeinflussen. Mutationen in den RTKs oder in den nachgeschalteten Proteinen, wie Ras und Raf führen zu einem gestörten RTK-signaling über den ERK-Signalweg, was das Voranschreiten der Krankheit fördert [114-116]. Obwohl die Kernelemente der RTK-ERK-Signalkaskade gut charakterisiert sind, zeigen neuere funktionelle Studien zur Genomik und Proteomik, dass die Signalverarbeitung über diesen Weg weitaus komplexer ist als bisher angenommen. In einer Studie von Olsen *et al.* wurden nach Stimulation von HeLa-Zellen mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) (einem Liganden für den RTK-EGF-Rezeptor, EGFR) über 600 Proteine identifiziert, die daraufhin phosphoryliert vorlagen, was darauf hinweist, dass neben den bekannten Größen im EGF-ERK-Signalweg wie Ras, Raf oder die Mitogen-aktivierten-Protein-Kinasen (MAPK) eine große Anzahl anderer Proteine, einschließlich

Transkriptionsfaktoren eine Rolle spielen [117]. In einer Untersuchung von Vinayagam *et al.* 2011 wurden in einem kombinierten Hefe-Zwei-Hybrid-Verfahren (Yeast Two-Hybrid System, abgekürzt Y2H) ca. 450 verschiedene Proteine der Signalverarbeitung als Köder genutzt um annähernd 2500 Protein-Protein-Interaktionen (PPI) ausfindig zu machen [118]. Nach Kombination dieser Interaktionskarte mit öffentlich verfügbaren PPI-Daten erzielten die Wissenschaftler ein gerichtetes Netzwerk des Signaltransduktionsflusses mithilfe der Bayes-Klassifikation. Letztere ordnet jedem Objekt eine Klasse zu, zu der es mit der größten Wahrscheinlichkeit gehört. Dadurch generierten sie ein gerichtetes Netzwerk, welches 32.706 PPIs mit 6339 humanen Proteinen enthält. Dies repräsentiert potentielle input- und output-Beziehungen zwischen interagierenden Proteinen – von aktivierten Membranrezeptoren zu Transkriptionsfaktoren. Dabei wurde als ein Output-Gen der MAP-Kinase 6 (auch als ERK3 bekannt) ZNF671 identifiziert ([118] supplemental Material Tabelle S6). Die Autoren schreiben, dass diese gefundenen Interaktionspartner direkt mit dem Ausgangsprotein interagieren oder über mehrere Zwischenwege – wie vermutlich bei ZNF671. Es geht bei diesen Untersuchungen also nicht darum einen einzigen Signalweg mit einer bestimmten biologischen Funktion zu definieren, sondern gerichtete PPIs zu prognostizieren, die in verschiedenen zellulären Wegen und Prozessen von Bedeutung sein könnten. Dass in diesem Zusammenhang ZNF671 auftaucht, ist ein Hinweis darauf, dass dieser Transkriptionsfaktor unter bestimmten Umständen (z.B. während der Tumorprogression) am MAP-Kinase-Signalweg beteiligt ist. Die Aktivierung dieses Weges über Mitogene wie z.B. HPV aktiviert die Kaskade Raf → MEK → ERK. Dieser Signalweg ist bei 30% aller Krebsarten hyperaktiviert [119]. In einem zusammenfassenden Bericht von Kostenko *et al.* ist beschrieben, dass die MAP-Kinase MAP-K6 bzw. hier ERK3 genannt an tumorerzeugenden Prozessen beteiligt ist [120]. Die MAP-Kinasen spielen eine entscheidende Rolle in vielen Zellvorgängen, wie Proliferation, Differenzierung, Genexpression, Apoptose, Metabolismus und Motilität. Ein typischer MAPK-Weg besteht aus einer Kaskade von drei aufeinanderfolgenden Phosphorylierungsereignissen: MAP3K → MAP2K → MAPK → MAPKAPK [121-125]. Die Signalkaskade um ERK3 ist nicht genau verstanden: ? → PAK1-3 → ERK3 → MK5/PRAK. In Abbildung 38 ist der mögliche Signalweg um ERK3 dargestellt:

(1-2) Onkogene Ras Mutanten steigern das ERK4 Transkriptionslevel und aktivieren Raf

Diskussion

- (3) Raf stimuliert die Transkription von ERK3
- (4) IGB2BP (RNA-Bindungsprotein) inhibiert Translation der ERK4 mRNA
- (5) ERK3 und ERK4 aktivieren MK5
- (6) MK5 phosphoryliert Hsp27, was Aktin-Remodellierung und Zellmigration beeinflusst
- (7) ZNF671 kann direkt oder über unbekannte Interaktionspartner mit ERK3 interagieren

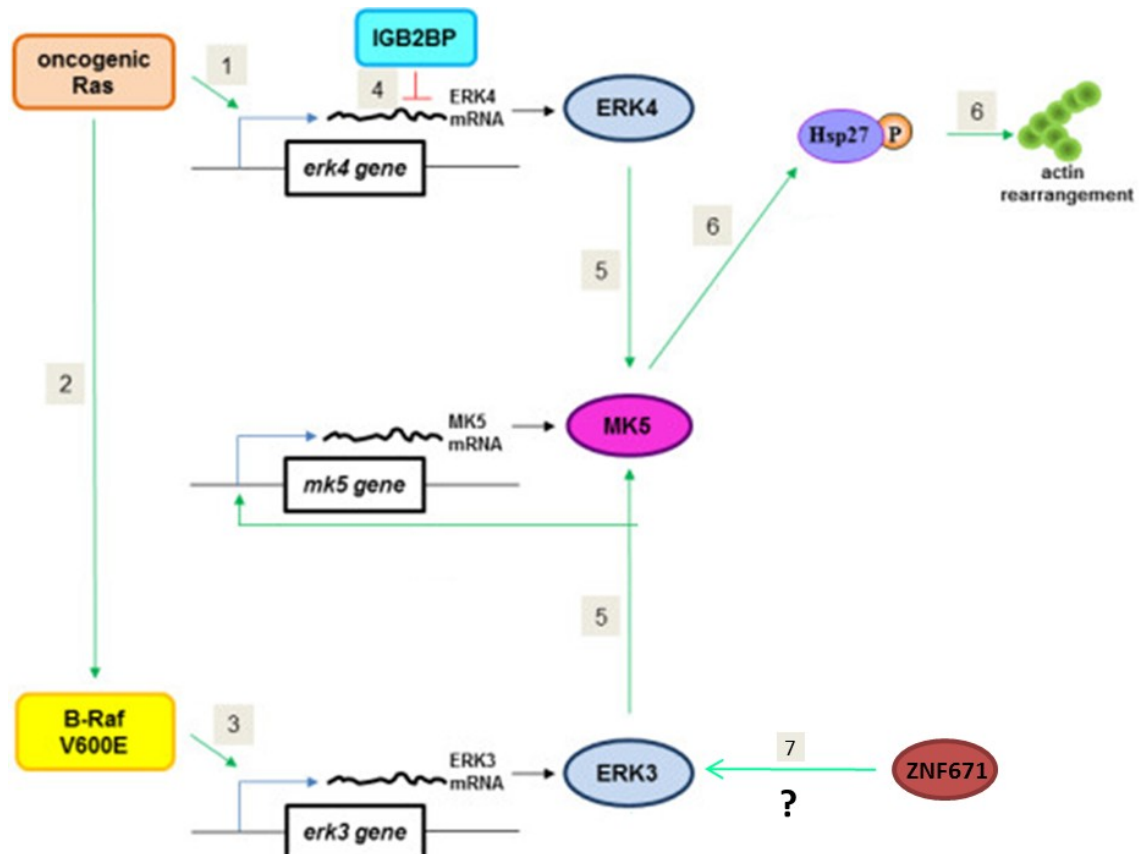


Abbildung 38 – schematische Darstellung des molekularen Mechanismus um ZNF671 und ERK3, modifiziert nach Kostenko 2012

In diesem Modell ist beschrieben, wie ZNF671 über die Kaskade $\text{ZNF671} \rightarrow \text{ERK3} \rightarrow \text{MK5} \rightarrow \text{Phosphorylierung Hsp27}$ die Zellmigration beeinflussen könnte. Dieser Prozess zeigte sich in den hier zu Grunde liegenden Funktionsstudien *in vitro* tatsächlich durch ZNF671 beeinflusst.

Auf der Homepage von GeneCards, einer Biochemie-Onlinedatenbank des Weizmann-Institut für Wissenschaften, die Profile von einzelnen Genen oder Proteinen aufführt, findet man für ZNF671 eine STRING Karte (siehe Abbildung 39) [126]. Dieses Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins ist eine Bioinformatik-Datenbank,

Diskussion

die einen umfassenden Überblick über direkte (physikalische) und indirekte (funktionelle) Zusammenhänge und Interaktionen zwischen Proteinen gibt.

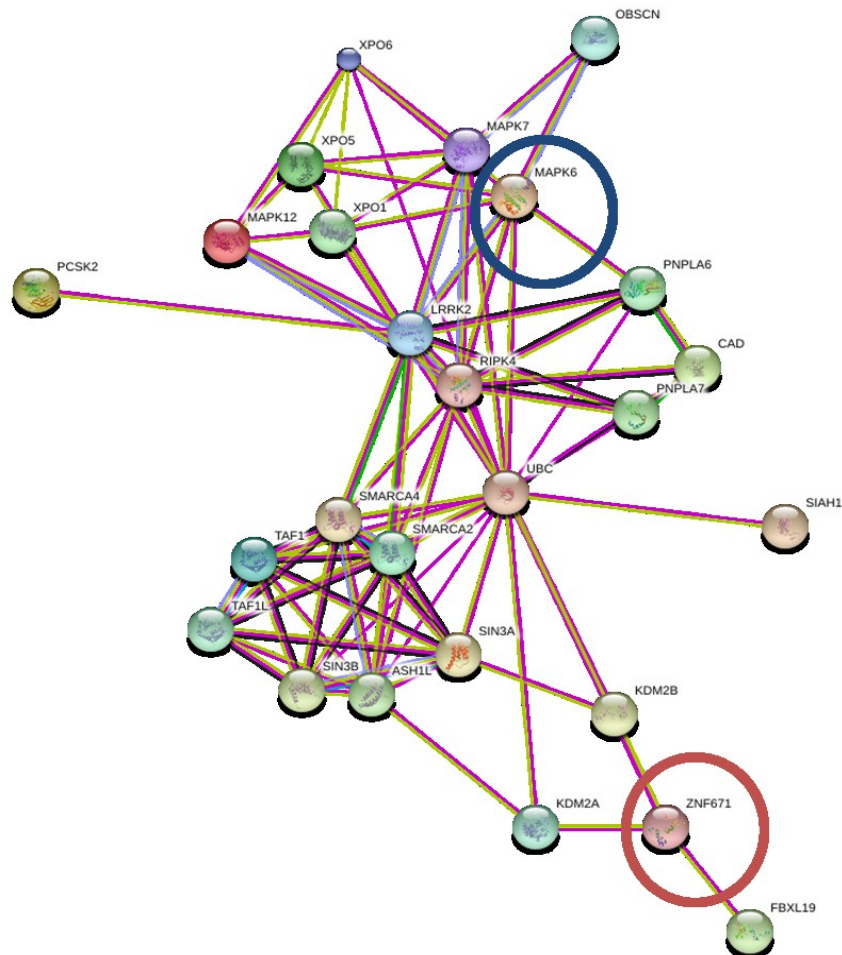


Abbildung 39 – STRING Interaktionsnetzwerk für ZNF671, die Gene ZNF671 und MAPK6 sind hervorgehoben, dargestellt ist, über welche Zwischenschritte diese interagieren können (modifiziert nach <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ZNF671>)

Zu sehen ist in diesem Netzwerk, dass ZNF671 über die Proteine KDM2B und UBC mit MAPK6 (ERK3) verbunden ist. Die Lysin (K)-spezifische Demethylase 2B KDM2B kodiert für ein Mitglied der F-Box-Protein-Familie, die durch eine F-Box gekennzeichnet ist. Diese Proteine bilden eine der vier Untereinheiten des Ligase-Komplexes und nehmen eine wichtige Funktion in der phosphorylierungsabhängigen Ubiquitinierung ein. Sie werden aber auch mit anderen Zellfunktionen, wie der Signalübertragung und Regulation des Zellzyklus in Verbindung gebracht [127]. Ubiquitin C (UBC) ist eine Polyubiquitinvorstufe und wird bei der Ubiquitinierung benötigt. Der Prozess der Ubiquitinierung spielt für viele zelluläre Prozesse eine wichtige Rolle, wie

Diskussion

beispielsweise Proteinabbau, DNA-Reparatur und Zellzyklusregulation. Er dient der Veränderung bereits translatierter Proteine (posttranslationale Modifikation) und kann auch an der Entstehung verschiedener Krankheiten beteiligt sein [128]. Möglicherweise hat die Hypermethylierung von ZNF671 einen Einfluss auf wichtige Ubiquitinierungsprozesse von MAPK6. Hinweise einer solchen Ubiquitinierung gibt es und es wurde auch gezeigt, dass dieser Prozess wichtig für den Zellzyklusinhibitor p21 ist [129]. Dieses Protein ist ein bekanntes Tumorsuppressorgen, welches das Krebswachstum hemmt [130].

5.2.4 ZNF671 in anderen Krebsentitäten

ZNF671 ist ein noch recht unbekanntes und wenig untersuchtes Tumorsuppressorgen. Tatsächlich ist es aktuell nur in drei verschiedenen Krebsentitäten beschrieben: dem kleinzelligen Nierenzellkarzinom [131], dem Urothelkarzinom [132] und dem Zervixkarzinom [133]. Alle Veröffentlichungen zu ZNF671 sind zum jetzigen Zeitpunkt nicht älter als zwei Jahre und stehen im direkten Zusammenhang mit Methylierung. Eine Gruppe aus Tokio untersuchte den CpG-Insel-Methylierungsphänotyp (CIMP) im kleinzelligen Nierenzellkarzinom über das MassARRAY-System [131]. Es wurden insgesamt 299 CpGs in 88 CIMP-negativen und 14 CIMP-positiven Gewebeproben aus Patienten mit kleinzelligem Nierenzellkarzinom analysiert. Die CIMP-positiven, also hypermethylierten Karzinome sind pathologisch aggressiv und assoziiert mit schlechter Prognose. Die Gruppe um Tian identifizierten nun 17 Gene, die als Kennzeichen für CIMP-positive Nierenzellkarzinome gelten – darunter ZNF671. In Abbildung 40 ist die durchschnittliche Promotormethylierung von ZNF671 in CIMP-positiven und -negativen Karzinomen gezeigt.

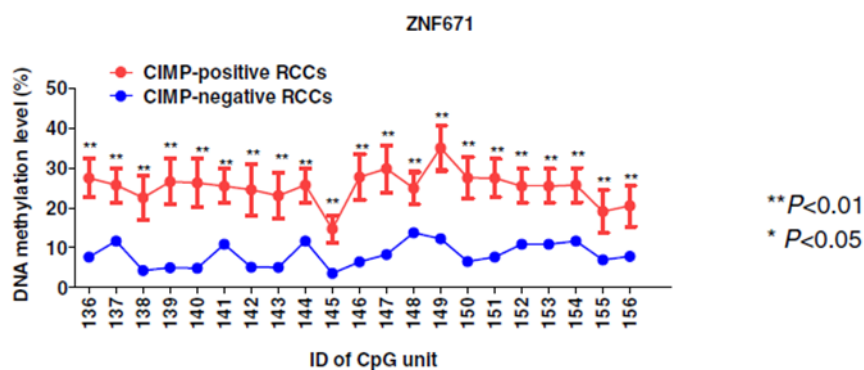


Abbildung 40 – mittleres Methylierungslevel der 21 CG-Dinukleotide von ZNF671 in CIMP-positiven (rot) und negativen (blau) kleinzelligen Nierenzellkarzinomen, Tian *et al.* 2014

Diskussion

Das Methylierungslevel der dargestellten 21 CG-Dinukleotide ist in CIMP-positiven Nierenzellkarzinomen (rote Linie) signifikant höher, als in den CIMP-negativen (blaue Linie). Damit könnte allein die Methylierung von ZNF671 eine Auskunft über die Aggressivität des Tumors liefern.

Die Gruppe um Yeh identifizierte eine Promotor-Hypermethylierung von ZNF671 ebenfalls über Methylierungs-Microarray-Untersuchungen im Blasenkarzinom. Nach Validierung der Ergebnisse durch Bisulfit-Pyrosequenzierung führten sie *in vitro* Studien durch, die zeigten, dass die Methylierung auch in einer Herabregulation der Genexpression resultiert. Eine Unterscheidung der verschiedenen Transkriptvarianten fand dabei nicht statt. In Urothelkarzinom-Zelllinien beobachteten die Wissenschaftler nach einer ektopischen Expression von ZNF671 eine verminderte Invasion [132]. In Abbildung 41 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen zu sehen. Die stabil ZNF671 überexprimierenden Zellkulturen zeigen einen deutlichen Verlust der Invasionsfähigkeit im Vergleich zu den Kontrollzellen. Auch die quantitative Analyse des Invasionstests verdeutlicht dieses Ergebnis. Die Durchführung erfolgte hierbei ebenso mittels Zellkultur-Inserts und über ein FCS-Konzentrationsgefälle vergleichbar den dieser Arbeit zu Grunde liegenden Versuchen.

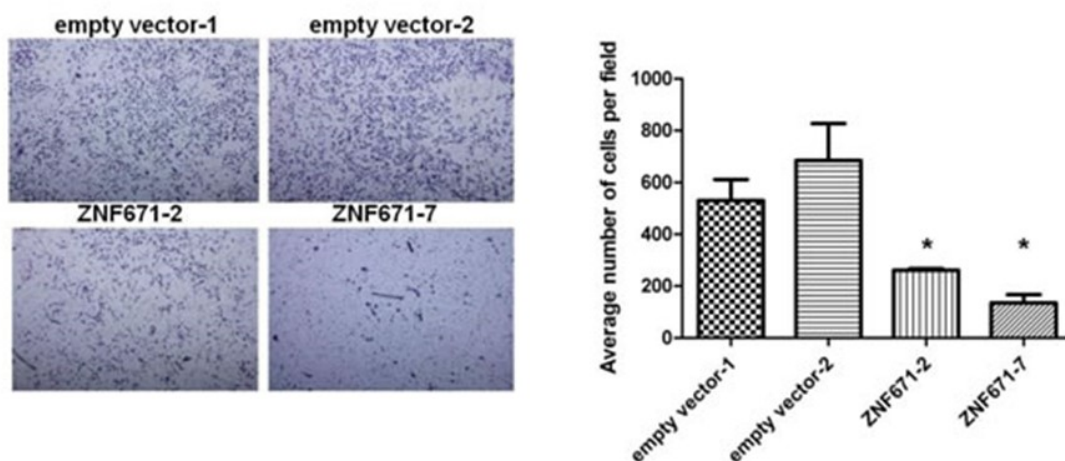


Abbildung 41 – Ergebnisse des Invasionsassays nach ektopischer Expression von ZNF671, Yeh *et al.* 2015

Klinisch ist eine hohe ZNF671-Methylierung in Tumorgewebe der Blase und oberen Harnwege mit einer schlechteren Prognose und geringerem krankheitsfreien Überleben assoziiert. Auch in diesen Untersuchungen gilt ZNF671 als Tumorsuppressorgen und hat das Potential als Biomarker für die Prognose von Blasenkrebs zu fungieren.

5.3 Ausblick

Um genauer zu verstehen, wie ZNF671 in der Zervixkarzinogenese wirkt und eingreift und welche Bedeutung diesem Protein zukommt, sind weitere Analysen erforderlich. Sinnvoll wäre es zunächst über ein Knockdown-Experiment mit siRNA- oder shRNA-tragenden Vektoren zu überprüfen, ob die durch eine Überexpression generierten Effekte im Bereich der Motilität der Zellen reversibel sind und die Zellen wieder verstärkt migrieren und invadieren können. Eine neuere und eventuell erfolgsversprechendere Methode ist die Generierung eines Knockouts mittels des CRISPR/Cas-Systems [134]. Dieses von Jinek und Kollegen 2012 entwickelte Verfahren entstammt einem adaptiven antiviralen Abwehrmechanismus aus Bakterien, dem CRISPR [135]. Es wird verwendet, um DNA an einer bestimmaren DNA-Sequenz zu schneiden. Dadurch können DNA-Sequenzen entfernt oder andere DNA-Sequenzen an dieser Stelle eingefügt werden. Mit dieser Technik könnte man gezielt ZNF671 *in vitro* ausschalten und über die hier in der Arbeit beschriebenen Funktionsassays untersuchen, inwieweit die kanzerogenen Eigenschaften wiederhergestellt werden konnten.

Außerdem könnte man experimentell genauer untersuchen, welche direkten Interaktionspartner ZNF671 besitzt. Zu diesem Zweck würde sich, wie die Gruppe um Vinayagam auch angewendet hat, das Hefe-2-Hybridsystem eignen. Dafür ist ein Köderprotein – das Baitprotein – nötig und der Transkriptionsfaktor GAL4, der eine Bindedomäne für das GOI enthält. Das Bait-Fusionsprotein bindet an die GAL4-Bindestelle und ein möglicher Interaktionspartner – das Prey-Fusionsprotein muss nun in der Lage sein, an dieses Bait-Fusionsprotein zu binden. Nur wenn eine solche Interaktion stattfindet, resultiert daraus eine funktionelle Rekonstitution des GAL4-Transkriptionsfaktors, was eine Expression des Reportergens zur Folge hat. Über dieses kann die Interaktion detektiert werden [136].

Es wird deutlich, dass diese ersten Schritte in der Beschreibung von ZNF671 als potentiell Tumor suppressor in der Zervixkarzinogenese noch längst kein vollständiges Bild dieses Proteins wiedergeben. Es bleibt daher spannend, ob es im Weiteren eindeutiger als Tumorsuppressor mit diagnostischer Relevanz charakterisiert werden kann und welche Funktionen es im benignen Umfeld vermittelt.

6 Literaturverzeichnis

1. Hillemanns P, Thaler C and Kimmig R. [Epidemiology and diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia--is the present concept of screening and diagnosis still current?]. *Gynäkologisch-geburtshilfliche Rundschau*. 1997; 37(4):179-190.
2. Lukaszuk K, Liss J, Gulczynski J, Nowaczyk M, Nakonieczny M, Piatkowski M, Sliwinski W, Baay M, Wozniak I, Maj B and Lukaszuk M. Predictive value of HPV DNA in lymph nodes in surgically treated cervical carcinoma patients--a prospective study. *Gynecol Oncol*. 2007; 104(3):721-726.
3. GLOBOCAN. (2012). <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
4. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E and Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011; 61(2):69-90.
5. Schiffman MH and Castle P. Epidemiologic studies of a necessary causal risk factor: human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 2003; 95(6):E2.
6. Quinn M, Babb P, Jones J and Allen E. Effect of screening on incidence of and mortality from cancer of cervix in England: evaluation based on routinely collected statistics. *Bmj*. 1999; 318(7188):904-908.
7. Willoughby BJ, Faulkner K, Stamp EC and Whitaker CJ. A descriptive study of the decline in cervical screening coverage rates in the North East and Yorkshire and the Humber regions of the UK from 1995 to 2005. *Journal of public health*. 2006; 28(4):355-360.
8. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical C. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2007; 120(4):885-891.
9. Anttila T, Saikku P, Koskela P, Bloigu A, Dillner J, Ikaheimo I, Jellum E, Lehtinen M, Lenner P, Hakulinen T, Narvanen A, Pukkala E, Thoresen S, Youngman L and Paavonen J. Serotypes of Chlamydia trachomatis and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. *JAMA*. 2001; 285(1):47-51.
10. International Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical C. Cervical carcinoma and reproductive factors: collaborative reanalysis of individual data on 16,563 women with cervical carcinoma and 33,542 women without cervical carcinoma from 25 epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2006; 119(5):1108-1124.
11. Luhn P, Walker J, Schiffman M, Zuna RE, Dunn ST, Gold MA, Smith K, Mathews C, Allen RA, Zhang R, Wang S and Wentzensen N. The role of co-factors in the progression from human papillomavirus infection to cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2013; 128(2):265-270.
12. Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX and International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study G. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002; 359(9312):1093-1101.
13. Castle PE. Human papillomavirus (HPV) genotype 84 infection of the male genitalia: further evidence for HPV tissue tropism? *J Infect Dis*. 2008; 197(5):776-778.
14. Day PM, Lowy DR and Schiller JT. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology*. 2003; 307(1):1-11.
15. Bousarghin L, Touze A, Sizaret PY and Coursaget P. Human papillomavirus types 16, 31, and 58 use different endocytosis pathways to enter cells. *J Virol*. 2003; 77(6):3846-3850.
16. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*. 2005; 32 Suppl 1:S7-15.
17. Parazzini F, Negri E, La Vecchia C and Bocciolone L. Screening practices and invasive cervical cancer risk in different age strata. *Gynecol Oncol*. 1990; 38(1):76-80.
18. Parkin DM, Nguyen-Dinh X and Day NE. The impact of screening on the incidence of cervical cancer in England and Wales. *Br J Obstet Gynaecol*. 1985; 92(2):150-157.

19. Koss LG. The Papanicolaou test for cervical cancer detection. A triumph and a tragedy. *JAMA*. 1989; 261(5):737-743.
20. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, Szarewski A, Birembaut P, Kulasingam S, Sasieni P and Iftner T. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer*. 2006; 119(5):1095-1101.
21. Seki N, Kodama J, Kusumoto T, Nakamura K, Hongo A and Hiramatsu Y. Complications and obstetric outcomes after laser conization during pregnancy. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2010; 31(4):399-401.
22. Saslow D, Solomon D, Lawson HW, Killackey M, Kulasingam SL, Cain J, Garcia FA, Moriarty AT, Waxman AG, Wilbur DC, Wentzensen N, Downs LS, Jr., Spitzer M, Moscicki AB, Franco EL, Stoler MH, et al. American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer. *American journal of clinical pathology*. 2012; 137(4):516-542.
23. Szalmas A and Konya J. Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2009; 19(3):144-152.
24. Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR and Schiller JT. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(24):12180-12184.
25. Harper DM. Impact of vaccination with Cervarix (trade mark) on subsequent HPV-16/18 infection and cervical disease in women 15-25 years of age. *Gynecol Oncol*. 2008; 110(3 Suppl 1):S11-17.
26. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ and Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999; 189(1):12-19.
27. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H and de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010; 401(1):70-79.
28. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *The American journal of medicine*. 1997; 102(5A):3-8.
29. Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX and de Sanjose S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis*. 2010; 202(12):1789-1799.
30. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR and Stanley MA. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*. 2012; 30 Suppl 5:F55-70.
31. zur Hausen H. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Current topics in microbiology and immunology*. 1977; 78:1-30.
32. Bernard HU. Gene expression of genital human papillomaviruses and considerations on potential antiviral approaches. *Antiviral therapy*. 2002; 7(4):219-237.
33. Ziegert C, Wentzensen N, Vinokurova S, Kisseljov F, Einenkel J, Hoeckel M and von Knebel Doeberitz M. A comprehensive analysis of HPV integration loci in anogenital lesions combining transcript and genome-based amplification techniques. *Oncogene*. 2003; 22(25):3977-3984.
34. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD and Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. 1993; 75(3):495-505.
35. Munger K and Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res*. 2002; 89(2):213-228.
36. Talora C, Sgroi DC, Crum CP and Dotto GP. Specific down-modulation of Notch1 signaling in cervical cancer cells is required for sustained HPV-E6/E7 expression and late steps of malignant transformation. *Genes & development*. 2002; 16(17):2252-2263.
37. Zhao KN, Hengst K, Liu WJ, Liu YH, Liu XS, McMillan NA and Frazer IH. BPV1 E2 protein enhances packaging of full-length plasmid DNA in BPV1 pseudovirions. *Virology*. 2000; 272(2):382-393.

Literaturverzeichnis

38. Law JA and Jacobsen SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet.* 2010; 11(3):204-220.
39. Bird AP. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature.* 1986; 321(6067):209-213.
40. Robertson KD. DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet.* 2005; 6(8):597-610.
41. Baylin SB and Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer.* 2011; 11(10):726-734.
42. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet.* 2007; 8(4):286-298.
43. Herman JG and Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003; 349(21):2042-2054.
44. Ballestar E and Esteller M. Methyl-CpG-binding proteins in cancer: blaming the DNA methylation messenger. *Biochem Cell Biol.* 2005; 83(3):374-384.
45. Wagner PD, Verma M and Srivastava S. Challenges for biomarkers in cancer detection. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2004; 1022:9-16.
46. Rocco JW and Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Experimental cell research.* 2001; 264(1):42-55.
47. Zou HZ, Yu BM, Wang ZW, Sun JY, Cang H, Gao F, Li DH, Zhao R, Feng GG and Yi J. Detection of aberrant p16 methylation in the serum of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(1):188-191.
48. Wong IH, Lo YM, Zhang J, Liew CT, Ng MH, Wong N, Lai PB, Lau WY, Hjelm NM and Johnson PJ. Detection of aberrant p16 methylation in the plasma and serum of liver cancer patients. *Cancer Res.* 1999; 59(1):71-73.
49. Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, Goodman SN, Hidalgo OF, Vanaclocha V, Baylin SB and Herman JG. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med.* 2000; 343(19):1350-1354.
50. Shen L, Kondo Y, Rosner GL, Xiao L, Hernandez NS, Vilaythong J, Houlihan PS, Krouse RS, Prasad AR, Einspahr JG, Buckmeier J, Alberts DS, Hamilton SR and Issa JP. MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2005; 97(18):1330-1338.
51. Townsend DM and Tew KD. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene.* 2003; 22(47):7369-7375.
52. Nakamichi I, Tomita Y, Zhang B, Sugiyama H, Kanakura Y, Fukuhara S, Hino M, Kanamaru A, Ogawa H and Aozasa K. Correlation between promoter hypermethylation of GSTP1 and response to chemotherapy in diffuse large B cell lymphoma. *Annals of hematology.* 2007; 86(8):557-564.
53. Miyake T, Nakayama T, Naoi Y, Yamamoto N, Otani Y, Kim SJ, Shimazu K, Shimomura A, Maruyama N, Tamaki Y and Noguchi S. GSTP1 expression predicts poor pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy in ER-negative breast cancer. *Cancer Sci.* 2012; 103(5):913-920.
54. Zhang Y, Qu X, Jing W, Hu X, Yang X, Hou K, Teng Y, Zhang J and Liu Y. GSTP1 determines cis-platinum cytotoxicity in gastric adenocarcinoma MGC803 cells: regulation by promoter methylation and extracellular regulated kinase signaling. *Anti-cancer drugs.* 2009; 20(3):208-214.
55. Harden SV, Guo Z, Epstein JI and Sidransky D. Quantitative GSTP1 methylation clearly distinguishes benign prostatic tissue and limited prostate adenocarcinoma. *The Journal of urology.* 2003; 169(3):1138-1142.
56. Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell.* 2002; 108(2):171-182.
57. Esteller M, Corn PG, Baylin SB and Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res.* 2001; 61(8):3225-3229.

Literaturverzeichnis

58. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, Bussaglia E, Prat J, Harkes IC, Repasky EA, Gabrielson E, Schutte M, Baylin SB and Herman JG. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst.* 2000; 92(7):564-569.
59. Dobrovic A and Simpfendorfer D. Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res.* 1997; 57(16):3347-3350.
60. Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomaki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A, Nishikawa R, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet.* 2000; 24(2):132-138.
61. Delpu Y, Cordelier P, Cho WC and Torrisani J. DNA methylation and cancer diagnosis. *International journal of molecular sciences.* 2013; 14(7):15029-15058.
62. Auersperg N and Hawryluk AP. Chromosome observations on three epithelial-cell cultures derived from carcinomas of the human cervix. *J Natl Cancer Inst.* 1962; 28:605-627.
63. Lasfargues EY, Coutinho WG and Redfield ES. Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 1978; 61(4):967-978.
64. Auersperg N. Long-Term Cultivation of Hypodiploid Human Tumor Cells. *J Natl Cancer Inst.* 1964; 32:135-163.
65. Pattillo RA, Husa RO, Story MT, Ruckert AC, Shalaby MR and Mattingly RF. Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line. *Science.* 1977; 196(4297):1456-1458.
66. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A and Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology.* 1988; 106(3):761-771.
67. Graham FL, Smiley J, Russell WC and Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology.* 1977; 36(1):59-74.
68. Gey GO, Coffman, W. D. and Kubicek, M. T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research.* 1952; 12: 264.
69. Buick RN, Pullano R and Trent JM. Comparative properties of five human ovarian adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* 1985; 45(8):3668-3676.
70. Durst M, Dzarlieva-Petrusevska RT, Boukamp P, Fusenig NE and Gissmann L. Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene.* 1987; 1(3):251-256.
71. Solinas-Toldo S, Durst M and Lichter P. Specific chromosomal imbalances in human papillomavirus-transfected cells during progression toward immortality. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(8):3854-3859.
72. Soule HD and McGrath CM. A simplified method for passage and long-term growth of human mammary epithelial cells. *In vitro cellular & developmental biology : journal of the Tissue Culture Association.* 1986; 22(1):6-12.
73. Russo J, Soule HD, McGrath C and Rich MA. Reexpression of the original tumor pattern by a human breast carcinoma cell line (MCF-7) in sponge culture. *J Natl Cancer Inst.* 1976; 56(2):279-282.
74. Ellison G, Klinowska T, Westwood RF, Docter E, French T and Fox JC. Further evidence to support the melanocytic origin of MDA-MB-435. *Molecular pathology : MP.* 2002; 55(5):294-299.
75. Sykes JA, Whitescarver J, Jernstrom P, Nolan JF and Byatt P. Some properties of a new epithelial cell line of human origin. *J Natl Cancer Inst.* 1970; 45(1):107-122.
76. Mechtersheimer S, Gutwein P, Agmon-Levin N, Stoeck A, Oleszewski M, Riedle S, Postina R, Fahrenholz F, Fogel M, Lemmon V and Altevogt P. Ectodomain shedding of L1 adhesion molecule promotes cell migration by autocrine binding to integrins. *The Journal of cell biology.* 2001; 155(4):661-673.

Literaturverzeichnis

77. Friedl F, Kimura I, Osato T and Ito Y. Studies on a new human cell line (SiHa) derived from carcinoma of uterus. I. Its establishment and morphology. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine*. 1970; 135(2):543-545.
78. Freedman RS, Bowen JM, Leibovitz A, Pathak S, Siciliano MJ, Gallager HS and Giovanella BC. Characterization of a cell line (SW756) derived from a human squamous carcinoma of the uterine cervix. *In vitro*. 1982; 18(8):719-726.
79. Zhuang Z, Bertheau P, Emmert-Buck MR, Liotta LA, Gnarr J, Linehan WM and Lubensky IA. A microdissection technique for archival DNA analysis of specific cell populations in lesions < 1 mm in size. *Am J Pathol*. 1995; 146(3):620-625.
80. Avwioro. Histochemical uses of Haematoxylin. *JPCS*. 2011.
81. Hassler MR, Klisaroska A, Kollmann K, Steiner I, Bilban M, Schiefer AI, Sexl V and Egger G. Antineoplastic activity of the DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine in anaplastic large cell lymphoma. *Biochimie*. 2012; 94(11):2297-2307.
82. Li B and Machida CA. Development of simian retroviral vectors for gene delivery. *Methods in molecular medicine*. 2003; 76:353-365.
83. Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ and Rutter WJ. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*. 1979; 18(24):5294-5299.
84. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL and Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89(5):1827-1831.
85. Powell LM, Wallis SC, Pease RJ, Edwards YH, Knott TJ and Scott J. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell*. 1987; 50(6):831-840.
86. Aguilar-Lemarroy A, Gariglio P, Whitaker NJ, Eichhorst ST, zur Hausen H, Krammer PH and Rosl F. Restoration of p53 expression sensitizes human papillomavirus type 16 immortalized human keratinocytes to CD95-mediated apoptosis. *Oncogene*. 2002; 21(2):165-175.
87. Dapson R, Horobin RW and Kiernan J. Hematoxylin shortages: their causes and duration, and other dyes that can replace hemalum in routine hematoxylin and eosin staining. *Biotech Histochem*. 2010; 85(1):55-63.
88. Miller J, McLachlan AD and Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J*. 1985; 4(6):1609-1614.
89. Krishna SS, Majumdar I and Grishin NV. Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic acids research*. 2003; 31(2):532-550.
90. Wolfe SA, Nekudova L and Pabo CO. DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*. 2000; 29:183-212.
91. Hughes TR. *A Handbook of Transcription Factors*. 2011; 52 (ISBN: 978-90-481-9068-3 (Print) 978-90-481-9069-0 (Online)).
92. Margolin JF, Friedman JR, Meyer WK, Vissing H, Thiesen HJ and Rauscher FJ, 3rd. Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(10):4509-4513.
93. Verma IM and Somia N. Gene therapy -- promises, problems and prospects. *Nature*. 1997; 389(6648):239-242.
94. Hanahan D and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1):57-70.
95. Holliday R and Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*. 1975; 187(4173):226-232.
96. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971; 68(4):820-823.
97. Gort EH, Suijkerbuijk KP, Roothaan SM, Raman V, Vooijs M, van der Wall E and van Diest PJ. Methylation of the TWIST1 promoter, TWIST1 mRNA levels, and immunohistochemical expression of

Literaturverzeichnis

TP53 in breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2008; 17(12):3325-3330.

98. Baylin SB and Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends in genetics : TIG.* 2000; 16(4):168-174.

99. Jones PA and Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet.* 1999; 21(2):163-167.

100. Kuzmin I, Liu L, Dammann R, Geil L, Stanbridge EJ, Wilczynski SP, Lerman MI and Pfeifer GP. Inactivation of RAS association domain family 1A gene in cervical carcinomas and the role of human papillomavirus infection. *Cancer Res.* 2003; 63(8):1888-1893.

101. Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, Stone RM, Nelson D, Powell BL, DeCastro CM, Ellerton J, Larson RA, Schiffer CA and Holland JF. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2002; 20(10):2429-2440.

102. Kantarjian H, Oki Y, Garcia-Manero G, Huang X, O'Brien S, Cortes J, Faderl S, Bueso-Ramos C, Ravandi F, Estrov Z, Ferrajoli A, Wierda W, Shan J, Davis J, Giles F, Saba HI, et al. Results of a randomized study of 3 schedules of low-dose decitabine in higher-risk myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia. *Blood.* 2007; 109(1):52-57.

103. Jones PA and Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell.* 1980; 20(1):85-93.

104. Vesely J CA. *Pharmac Ther A.* 1978; 2: 813-840.

105. Lu LJ and Randerath K. Mechanism of 5-azacytidine-induced transfer RNA cytosine-5-methyltransferase deficiency. *Cancer Res.* 1980; 40(8 Pt 1):2701-2705.

106. Lee TT and Karon MR. Inhibition of protein synthesis in 5-azacytidine-treated HeLa cells. *Biochem Pharmacol.* 1976; 25(15):1737-1742.

107. Glazer RI, Peale AL, Beisler JA and Abbasi MM. The effect of 5-azacytidine and dihydro-5-azacytidine on nuclear ribosomal RNA and poly(A) RNA synthesis in L1210 cells in vitro. *Molecular pharmacology.* 1980; 17(1):111-117.

108. Weiss JW and Pitot HC. Inhibition of ribosomal ribonucleic acid maturation by 5-azacytidine and 8-azaguanine in Novikoff hepatoma cells. *Archives of biochemistry and biophysics.* 1974; 160(1):119-129.

109. Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Chan LK, Heung MS, Chan CS, Cheung AY, Chung TK and Wong YF. Epigenetic and genetic alternation of PTEN in cervical neoplasm. *Gynecol Oncol.* 2004; 93(3):621-627.

110. Theodor H. Schiebler H-WK. (2007). *Anatomie: Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie*, 10. Auflage. (Steinkopf Verlag.

111. Friedman A and Perrimon N. Genetic screening for signal transduction in the era of network biology. *Cell.* 2007; 128(2):225-231.

112. Ideker T and Sharan R. Protein networks in disease. *Genome Res.* 2008; 18(4):644-652.

113. Jorgensen C and Linding R. Simplistic pathways or complex networks? *Curr Opin Genet Dev.* 2010; 20(1):15-22.

114. Henson ES and Gibson SB. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. *Cellular signalling.* 2006; 18(12):2089-2097.

115. Kolch W. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2005; 6(11):827-837.

116. Roberts PJ and Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene.* 2007; 26(22):3291-3310.

117. Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, Mortensen P and Mann M. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell.* 2006; 127(3):635-648.

Literaturverzeichnis

118. Vinayagam A, Stelzl U, Foulle R, Plassmann S, Zenkner M, Timm J, Assmus HE, Andrade-Navarro MA and Wanker EE. A directed protein interaction network for investigating intracellular signal transduction. *Science signaling*. 2011; 4(189):rs8.
119. Garnett MJ and Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer cell*. 2004; 6(4):313-319.
120. Kostenko S, Dumitriu G and Moens U. Tumour promoting and suppressing roles of the atypical MAP kinase signalling pathway ERK3/4-MK5. *Journal of molecular signaling*. 2012; 7(1):9.
121. Johnson GL and Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*. 2002; 298(5600):1911-1912.
122. Imajo M, Tsuchiya Y and Nishida E. Regulatory mechanisms and functions of MAP kinase signaling pathways. *IUBMB life*. 2006; 58(5-6):312-317.
123. Zhang Y and Dong C. Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2007; 64(21):2771-2789.
124. Krishna M and Narang H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2008; 65(22):3525-3544.
125. Cargnello M and Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2011; 75(1):50-83.
126. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ZNF671>.
127. Craig KL and Tyers M. The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Progress in biophysics and molecular biology*. 1999; 72(3):299-328.
128. Pearce MJ, Mintseris J, Ferreyra J, Gygi SP and Darwin KH. Ubiquitin-like protein involved in the proteasome pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. 2008; 322(5904):1104-1107.
129. Coulombe P, Rodier G, Bonneil E, Thibault P and Meloche S. N-Terminal ubiquitination of extracellular signal-regulated kinase 3 and p21 directs their degradation by the proteasome. *Molecular and cellular biology*. 2004; 24(14):6140-6150.
130. Gartel AL and Radhakrishnan SK. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res*. 2005; 65(10):3980-3985.
131. Tian Y, Arai E, Gotoh M, Komiyama M, Fujimoto H and Kanai Y. Prognostication of patients with clear cell renal cell carcinomas based on quantification of DNA methylation levels of CpG island methylator phenotype marker genes. *BMC Cancer*. 2014; 14:772.
132. Yeh CM, Chen PC, Hsieh HY, Jou YC, Lin CT, Tsai MH, Huang WY, Wang YT, Lin RI, Chen SS, Tung CL, Wu SF, Chang DC, Shen CH, Hsu CD and Chan MW. Methylomics analysis identifies ZNF671 as an epigenetically repressed novel tumor suppressor and a potential non-invasive biomarker for the detection of urothelial carcinoma. *Oncotarget*. 2015; 6(30):29555-29572.
133. Hansel A, Steinbach D, Greinke C, Schmitz M, Eiselt J, Scheungraber C, Gajda M, Hoyer H, Runnebaum IB and Durst M. A promising DNA methylation signature for the triage of high-risk human papillomavirus DNA-positive women. *PloS one*. 2014; 9(3):e91905.
134. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA and Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012; 337(6096):816-821.
135. Sorek R, Kunin V and Hugenholtz P. CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol*. 2008; 6(3):181-186.
136. Fields S and Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*. 1989; 340(6230):245-246.

7 Anhang

7.1 Verwendete Gewebe

7.1.1 Gesamtschnitte

Probenbezeichnung	Entität
2671N	Normalgewebe
2678N	Normalgewebe
2682N	Normalgewebe
2683N	Normalgewebe
2684N	Normalgewebe
5881N	Normalgewebe
5882N	Normalgewebe
5884N	Normalgewebe
5886N	Normalgewebe
5888N	Normalgewebe
5889N	Normalgewebe
5891N	Normalgewebe
5892N	Normalgewebe
5897N	Normalgewebe
5901N	Normalgewebe
5906N	Normalgewebe
5908N	Normalgewebe
5910N	Normalgewebe
5912N	Normalgewebe
5913N	Normalgewebe
5916N	Normalgewebe
5917N	Normalgewebe
1499T	CIN3
2055T	CIN3
2062T	CIN3
2451T	CIN3
2566T	CIN3
2578T	CIN3
3595T	CIN3
4198T	CIN3
4225T	CIN3
4372T	CIN3
5107T	CIN3
5405T	CIN3
5410T	CIN3
5413T	CIN3

Anhang

5414T	CIN3
5420T	CIN3
5423T	CIN3
5427T	CIN3
5431T	CIN3
5432T	CIN3
1509T1b	CxCa
2085T1	CxCa
2319T2b	CxCa
2707T1	CxCa
2723 Ca	CxCa
3256T1	CxCa
3719T2b	CxCa
4112T2b	CxCa
4112T2c	CxCa
4112T2e	CxCa
4338T4c	CxCa
4338T4d	CxCa
4497T2	CxCa
4502T	CxCa
4995Tb	CxCa
5189T2b	CxCa
5240T4b	CxCa
5254Tb	CxCa
841T3b	CxCa
892T1d	CxCa

7.1.2 Mikrodisektion

Probenbezeichnung	Entität
2655N	Normalgewebe
2657N	Normalgewebe
2659N	Normalgewebe
2660N	Normalgewebe
2661N	Normalgewebe
2664N	Normalgewebe
2665N	Normalgewebe
2668N	Normalgewebe
2675N	Normalgewebe
2678N	Normalgewebe
2655T	CIN3
2658T	CIN3
2660T	CIN3

2674T	CIN3
2683T	CIN3
5411T	CIN3
5414T	CIN3
5420T	CIN3
5427T	CIN3
5432T	CIN3
841T2a	CxCa
892T1	CxCa
1509T1b	CxCa
2319T2b	CxCa
3719T2a	CxCa
4112T2b	CxCa
4338T5b	CxCa
4806T1b	CxCa
4822T	CxCa
5240T3a	CxCa

7.2 Primersequenzen

Versuch	Primernamen	Oligosequenz	Produktgröße	Ta
MSP-ACTB	907-betaActin-MSP-F	TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT	133 bp	61°C
	908-betaActin-MSP-R	AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA		
MSP-ASTN1	750-ASTN1_f1	CGTAAGCGTTGTTAGCGTAGC	94 bp	61°C
	751-ASTN1_r1	TAAATACGAAACGCGAAATCG		
MSP-DLX1	919-DLX1_f	TATCGGGATTGCGGTTTGTAC	153 bp	64,5°C
	920-DLX1_r	CGACCGAACTAAACTCAACTCG		
MSP-DMRTA2	1496 - DMRTA2-Fneu	GTTATGATACGTTGGCGTTTCG	221 bp	64,5°C
	1497 - DMRTA2-Rneu	ACGACCGCTGCATCGCTACCG		
MSP-EDIL3	384-EDIL3_f	GTTTTCGGCGGTTTCGTC	103 bp	63,7°C
	385-EDIL3_r	CGAACGCTCGACTATCGC		
MSP-ITGA4	324-ITGA4_f	CGAATTCGTTTTCGAAGGGTC	152 bp	61°C
	325-ITGA4_r1	CACGACCGAATAACCGAACAAC		
MSP-MEF2c	1580_MEF2Cf3	CGTGCGTGCGTTACGGGC	108 bp	64,5°C
	1581_MEF2Cr3	CGCGCCAAACCAACGTAACCG		
MSP-NXPH1	1396_M-NXPH1_f1	TTGGCGAAGAATTAGTCGTC	152 bp	61°C
	1397_M-NXPH1_r1	CTACGCTCCTCGAATACGAAT		
MSP-PCDHGB3	1451-M-PCDHGB3-F	GCGTAGCGAGTTTTCGATTAC	135 bp	59°C
	1452-M-PCDHGB3-R	CGATACATTATCGTTACGATCGTC		
MSP-RXFP3	762-RXFP3_f1	ATTTCCGAAAGCGTTTTTCGC	139 bp	61°C
	763-RXFP3_r1	CTACGTCTCTCCGCGATTATC		
MSP-SOX17	937-SOX17_f4	GGGATACGGTTTAAGAGTCGTTTC	226 bp	62,5°C

Anhang

	938-SOX17_r5	ACGATACTCCACTACTACGCCG		
MSP-SSTR1	1455-M-SSTR1-F	TTAAGGCGGTTTCGTTATCGTC	128 bp	67°C
	1456-M-SSTR1-R	CGTACCGTCGCTATTAACCG		
MSP-TRH	1401-M-TRH-F	CGTAGAGTCGGGGCGAATTC	192 bp	62,5°C
	1402-M-TRH-R	AAACCGAACATCGCGACGTC		
MSP-ZNF146	1463-M-ZNF146-F	TTTAACGCGTGTATTAATTCGC	153 bp	59°C
	1464-M-ZNF146-R	ACGTCGTAAACGCGAAACT		
MSP-ZNF568	1485_CpG46 F	TTTAGGGTATCGCGTTTTGC	201 bp	62,5°C
	1486_CpG46 R	AAAATCGATAACCCGACACACG		
MSP-ZNF671	913-ZNF671_f2	CGGAGGACGTAGTATTTATTCGC	103 bp	64,5°C
	915-ZNF671_r2	CTACGTCCCCGATCGAAACG		
qPCR-ACTB	357-betaActin_f	GCAGTGATCTCCTTCTGCATC	294 bp	56°C
	358-betaActin_r	GGACTTCGAGCAAGAGATGG		
qPCR-ASTN1	2097_cASTN1f	TGTCAAGGCTCAAGAAATAGCA	204 bp	60,5°C
	2098_cASTN1r	GCTTTCCTGGGACCTAACTC		
qPCR-DLX1	2125_DLX1-001f	AGACTCAGGTCAAGATCTGGT	217 bp	62,5°C
	2126_DLX1-001r	TACCACGATGTGTAGCTGGG		
qPCR-DMRTA2	2099_cDMRTAf	CTCAGAGGCCAAGTTGCAG	186 bp	64,5°C
	2100_cDMRTAr	AAGGACTCGCCATCGCC		
qPCR-EDIL3	2101_cEDIL3f	ACCAATGAAGACATGGTGTT	171 bp	62,5°C
	2102_cEDIL3r	CTCAGAACAACCCGACAG		
qPCR-HPRT	2133_HPRT_f	ACGAAGTGTTGGATATAAGC	214 bp	54°C
	2134_HPRT_r	ATAATTTTACTGGCGATGTC		
qPCR-ITGA4	2103_cITGA4f	CTTGCTAAGGACAAGACCTG	166 bp	64,5°C
	2104_cITGA4r	AACAATGTAACCTGGAACCTCC		
qPCR-MEF2c	2105_cMEF2Cf	CTTCCTTCATGAACGAATGC	218 bp	57,5°C
	2106_cMEF2Cr	CTTTGTAAATGTCACCTGTCTG		
qPCR-NXPH1	2107_cNXPH1f	TCCCTTCTCGCAGGATTCG	208 bp	62,5°C
	2108_cNXPH1r	ACATGTGACCAAGTAGACGGT		
qPCR-PCDHGB3	2111_cPCDHGB3f	TCCAGAAATGCCTTCTAATTCAGG	200 bp	62,5°C
	2112_cPCDHGB3r	TCCCATCAGCAGCTTCACTG		
qPCR-RXFP3	2095_cRXFP3f	GGCGCAAGTCCTCTATCAAC	194 bp	59°C
	2096_cRXFP3r	CATGGCAGTGAGGAAGAACA		
qPCR-SOX17	2129_SOX17f	GGGACATGAAGGTGAAGGGC	196 bp	64,5°C
	2130_SOX17r	GACTTGCCCAGCATCTTGCT		
qPCR-SSTR1	2113_cSSTR1f	CCAACTCTCCAGGCTTAGG	217 bp	66°C
	2114_cSSTR1r	GGTAAATGATTAATAGGCACCACC		
qPCR-TRH	2109_cTRHf	TGCTCGCTCTGGCTTTGAC	207 bp	66°C
	2110_cTRHr	GAAAGATCTGGGACGCGGAG		
qPCR-ZNF146	2115_cZNF146f	GCGAAAGTAGGAGGAAGACATAGG	170 bp	60,5°C
	2116_cZNF146r	TCAGGCTTCTTCCGCGCA		
qPCR-ZNF568	2123_ZNF568-002f	GACTGTTATTTAATAGGTCCTG	216 bp	60,5°C
	2124_ZNF568-002r	GATTGAGATGTCATTAGACC		

Anhang

qPCR- ZNF671	2117_cZNF671f	GCTTCTTGATGATGCTCAGAGAC	206 bp	62,5°C
	2118_cZNF671r	GCCAACAACCAGGTCTAAGTCC		
Long Expand PCR ZNF671	3094-ZNF-Klon2-F	CGCGCTAGCCACCATGTTGTCCCCAGT GTCCCGA	1622 bp	72°C (56°C)
	3148-ZNF-Klon2-R	GCGGCGGCCGCCACATTTGCTACACT CTTAAAG		
Hybridisie- rungs- sonde ZNF671	2866_sZNF671_f	GAACTCTGGGAGCAGCCATT	479 bp	60°C
	2867_sZNF671_r	ATGTGAAGCAGGCAGTTCCA		
Unterschei- dung Transkript- varianten ZNF671	ZNF-Afl-F	GAAAGTCCACACTGGGGAAA	207 bp	60°C
	ZNF-Afl-R	CTGCATCTGCTGCACTCATT		
	3117-ZNF-001-F	CCTGGCCGGGGTTCTGTAA	462 bp	62,5°C
	2118_cZNF671r	GCCAACAACCAGGTCTAAGTCC		
	3118-ZNF-003-F	ACTGGAAGCCATTTGTTTGG	195 bp	60°C
	3119-ZNF-003-R	GAAGGGGCAACCTCATTGTA		
	3120-ZNF-004-F	TGGGAGACAGGGTTCTCATC	168 bp	60°C
	3121-ZNF-004-R	CCCTGAGCAAATTCGAGAC		
	3181-ZNF-002-F	GACTCCGCGCGGGAATT	139 bp	62,5°C
	2118_cZNF671r	GCCAACAACCAGGTCTAAGTCC		
	2117_cZNF671f	GCTTCTTGATGATGCTCAGAGAC	90 bp	62,5°C
	3122-ZNF-006-R	CATGACTGCACGTGATCCAGTG		
	3123-ZNF-005-F	GGAGGTGTTGGGAAAGCGCG	175 bp	58°C
	3124-ZNF-005-R	AATGTTCTCCCCGCGCGG		
Sequenzier- primer pCDH	129-pCDH-F	GTCAGATCGCCTGGAGACG	-	-
	130-pCDH-R	GCGCTCTGCCCCACTGAC		
Sequenzier- primer ZNF671	3097-ZNF671seqF	CAGCCACATCTGGCCTTCTTCAG	-	-
	3098-ZNF671seqR	GTCTGGTGTTTAAAGAGGTCATAGC		

7.3 Tabellen zur Berechnung der relativen Expression und Methylierung CxCa-Zelllinien

ASTN1																
Ct-Werte PCR												Ct-Werte MSP				
Probe	Ct-Wert Expression									relative Expression		Probe	Ct-Wert Methylierung		relative Methylierung	
	HPRT 1	HPRT 2	HPRT 3	HPRT 4	HPRT Ø	ASTN1 1	ASTN1 2	ASTN1 3	ASTN1 Ø	Dct HKG-GOI	2 ^{ΔDct}		ACTB Ø	ASTN1 Ø	Dct HKG-GOI	2 ^{ΔDct}
C4-1	23,98	23,20	24,03	23,43	23,66	42	42	42	42,00	-18,34	0,00000301	C4-1	32,26	37,27	-5,01	0,03103414
CaSki	23,93	22,98	23,12	22,62	23,16	36,83	36,4	36,71	36,6466667	-13,48	0,00008727	CaSki	31,53	28,2	3,33	10,05610700
HeLa	22,28	21,37	22,37	21,62	21,91	25,9	26,01	26,19	26,0333333	-4,12	0,05737900	HeLa	32,95	28,97	3,98	15,77972327
ME 180	23,20	22,05	22,55	22,44	22,56	42	42	42	42	-19,44	0,00000141	ME 180	33,84	32,69	1,15	2,21913894
MRI H 186	22,25	21,43	22,08	21,73	21,87	31,44	30,15	30,96	30,85	-8,98	0,00198382	MRI H 186	32,20	29,15	3,05	8,28211939
SiHa	24,12	23,19	23,52	23,26	23,52	42	42	42	42	-18,48	0,00000274	SiHa	32,06	29,04	3,02	8,11167584
SW 756	22,58	22,16	22,69	21,99	22,36	42	42	42	42	-19,65	0,00000122	SW 756	32,98	42	-9,02	0,00192624
C33A	25,63	22,75	23,67	22,73	23,70	42	42	42	42	-18,31	0,00000309	C33A	31,40	36,89	-5,49	0,02225078
HPK-IA	24,82	23,69	24,67	24,26	24,36	26,7	26,95	28,14	27,2633333	-2,90	0,13366250	HPK-IA	32,43	35,42	-2,99	0,12586944
HPKII	24,46	23,58	23,62	23,72	23,85	42	42	42	42	-18,16	0,00000343	HPKII	32,03	42	-9,97	0,00099708
HpkIII	25,84	25,00	24,84	24,50	25,05	36,83	38,4	34,71	36,6466667	-11,60	0,00032177	HpkIII	31,84	33,17	-1,33	0,39776824
HpkV	24,00	23,71	23,31	23,08	23,53	42	42	42	42	-18,48	0,00000274	HpkV	31,82	37,31	-5,49	0,02225078
BT-474	24,55	24,67	25,85	25,15	25,06	36,83	35,35	36,71	36,2966667	-11,24	0,00041297	BT-474	30,66	36,35	-5,69	0,01937043
MCF-10a	25,21	24,80	25,41	25,16	25,15	42	42	42	42	-16,86	0,00000844	MCF-10a	30,91	42	-11,09	0,00045875
MCF7	20,84	20,45	20,88	20,49	20,67	42	42	42	42	-21,34	0,00000038	MCF7	32,02	28,77	3,25	9,51365692
MDA-MB	21,80	21,53	21,71	21,61	21,66	42	42	42	42	-20,34	0,00000075	MDA-MB	32,70	29,28	3,42	10,70342044
HOC7	23,95	22,97	23,79	24,13	23,71	42	42	42	42	-18,29	0,00000312	HOC7	31,88	29,41	2,47	5,54043787
OvMz	23,19	22,98	24,07	23,50	23,44	42	42	42	42	-18,57	0,00000258	OvMz	32,25	27,14	5,11	34,53530357
A 431	23,20	24,88	25,76	24,43	24,57	42	42	42	42	-17,43	0,00000565	A 431	31,70	28,58	3,12	8,69387890
HT1080	23,94	22,77	23,39	23,47	23,39	36,83	30,38	30,5	32,57	-9,18	0,00172702	HT1080	32,57	36,1	-3,53	0,08656934
HaCat	25,95	23,37	23,96	23,98	24,32	34,83	32,99	33,61	33,81	-9,49	0,00138586	HaCat	31,51	35,96	-4,45	0,04575268

Anhang

NXPH1																
Ct-Werte PCR											Ct-Werte MSP					
Probe	Ct-Wert Expression									relative Expression		Probe	Ct-Wert Methylierung		relative Methylierung	
	HPRT 1	HPRT 2	HPRT 3	HPRT 4	HPRT Ø	NXPH1 1	NXPH1 2	NXPH1 3	NXPH1 Ø	DcT HKG-GOI	2^ΔDcT		ACTB Ø	NXPH1 Ø	DcT HKG-GOI	2^ΔDcT
C4-1	23,98	23,20	24,03	23,43	23,66	42	42	42	42,00	-18,34	0,00000301	C4-1	32,26	31,36	0,90	1,86606598
CaSki	23,93	22,98	23,12	22,62	23,16	42	42	42	42	-18,84	0,00000213	CaSki	31,53	29,44	2,09	4,25748073
HeLa	22,28	21,37	22,37	21,62	21,91	42	42	42	42	-20,09	0,00000090	HeLa	32,95	30,85	2,10	4,28709385
ME 180	23,20	22,05	22,55	22,44	22,56	42	42	42	42	-19,44	0,00000141	ME 180	33,84	32,2	1,64	3,11665832
MRI H 186	22,25	21,43	22,08	21,73	21,87	42	42	42	42	-20,13	0,00000087	MRI H 186	32,20	30,36	1,84	3,58010028
SiHa	24,12	23,19	23,52	23,26	23,52	42	42	42	42	-18,48	0,00000274	SiHa	32,06	31,33	0,73	1,65863909
SW 756	22,58	22,16	22,69	21,99	22,36	39,5	38,79	37,3	38,53	-16,18	0,00001352	SW 756	32,98	42	-9,02	0,00192624
C33A	25,63	22,75	23,67	22,73	23,70	33,5	38,79	34,93	35,74	-12,05	0,00023664	C33A	31,40	35,99	-4,59	0,04152143
HPK-IA	24,82	23,69	24,67	24,26	24,36	42	42	42	42	-17,64	0,00000490	HPK-IA	32,43	42	-9,57	0,00131566
HPKII	24,46	23,58	23,62	23,72	23,85	42	42	42	42	-18,16	0,00000343	HPKII	32,03	32,53	-0,50	0,70710678
HpklIII	25,84	25,00	24,84	24,50	25,05	42	42	42	42	-16,96	0,00000787	HpklIII	31,84	35,73	-3,89	0,06745176
HpKV	24,00	23,71	23,31	23,08	23,53	42	42	42	42	-18,48	0,00000274	HpKV	31,82	42	-10,18	0,00086201
BT-474	24,55	24,67	25,85	25,15	25,06	31,16	32,8	31,73	31,8966667	-6,84	0,00871873	BT-474	30,66	32,94	-2,28	0,20589775
MCF-10a	25,21	24,80	25,41	25,16	25,15	42	42	42	42	-16,86	0,00000844	MCF-10a	30,91	28,75	2,16	4,46914855
MCF7	20,84	20,45	20,88	20,49	20,67	33,09	35,45	35,3	34,6133333	-13,95	0,00006326	MCF7	32,02	31,37	0,65	1,56916820
MDA-MB	21,80	21,53	21,71	21,61	21,66	42	42	42	42	-20,34	0,00000075	MDA-MB	32,70	32,45	0,25	1,18920712
HOC7	23,95	22,97	23,79	24,13	23,71	42	42	42	42	-18,29	0,00000312	HOC7	31,88	32,68	-0,80	0,57434918
OvMz	23,19	22,98	24,07	23,50	23,44	38,97	38,79	37,3	38,3533333	-14,92	0,00003229	OvMz	32,25	29,15	3,10	8,57418770
A 431	23,20	24,88	25,76	24,43	24,57	42	42	42	42	-17,43	0,00000565	A 431	31,70	33,24	-1,54	0,34388545
HT1080	23,94	22,77	23,39	23,47	23,39	41,5	36,79	34,76	37,6833333	-14,29	0,00004989	HT1080	32,57	38,3	-5,73	0,01884075
HaCat	25,95	23,37	23,96	23,98	24,32	33,08	38,79	37,3	36,39	-12,08	0,00023177	HaCat	31,51	42	-10,49	0,00069534

Anhang

SOX17																	
Ct-Werte PCR														Ct-Werte MSP			
Probe	Ct-Wert Expression									relative Expression		Probe	Ct-Wert Methylierung		relative Methylierung		
	HPRT 1	HPRT 2	HPRT 3	HPRT 4	HPRT Ø	SOX17 1	SOX17 2	SOX17 3	SOX17 Ø	DcT HKG-GOI	2 ^Δ DcT		ACTB Ø	SOX17 Ø	DcT HKG-GOI	2 ^Δ DcT	
C4-1	23,98	23,20	24,03	23,43	23,66	28,33	27,47	27,89	27,90	-4,24	0,05304400	C4-1	32,26	29,57	2,69	6,45313407	
CaSki	23,93	22,98	23,12	22,62	23,16	42	42	42	42	-18,84	0,00000213	CaSki	31,53	28,92	2,61	6,10503684	
HeLa	22,28	21,37	22,37	21,62	21,91	32,59	32,08	32,62	32,43	-10,52	0,00068103	HeLa	32,95	30,67	2,28	4,85677954	
ME 180	23,20	22,05	22,55	22,44	22,56	38,92	33,36	40,44	37,5733333	-15,01	0,00003024	ME 180	33,84	33,03	0,81	1,75321144	
MRI H 186	22,25	21,43	22,08	21,73	21,87	34,28	35,74	35,04	35,02	-13,15	0,00011021	MRI H 186	32,20	30,32	1,88	3,68075060	
SiHa	24,12	23,19	23,52	23,26	23,52	42	42	42	42	-18,48	0,00000274	SiHa	32,06	30,96	1,10	2,14354693	
SW 756	22,58	22,16	22,69	21,99	22,36	42	42	42	42	-19,65	0,00000122	SW 756	32,98	31,66	1,32	2,49666110	
C33A	25,63	22,75	23,67	22,73	23,70	36,92	38,53	40,44	38,63	-14,94	0,00003192	C33A	31,40	42	-10,60	0,00064429	
HPK-IA	24,82	23,69	24,67	24,26	24,36	33,27	32,36	32,53	32,72	-8,36	0,00304361	HPK-IA	32,43	42	-9,57	0,00131566	
HPKII	24,46	23,58	23,62	23,72	23,85	29,95	29,24	29,91	29,7	-5,86	0,01727704	HPKII	32,03	29,53	2,50	5,65685425	
HpkIII	25,84	25,00	24,84	24,50	25,05	38,92	35,12	40,44	38,16	-13,12	0,00011272	HpkIII	31,84	42	-10,16	0,00087405	
HpkV	24,00	23,71	23,31	23,08	23,53	28,68	28,52	28,08	28,4266667	-4,90	0,03345425	HpkV	31,82	42	-10,18	0,00086201	
BT-474	24,55	24,67	25,85	25,15	25,06	35,09	35	35,31	35,1333333	-10,08	0,00092495	BT-474	30,66	34,8	-4,14	0,05671995	
MCF-10a	25,21	24,80	25,41	25,16	25,15	42	42	42	42	-16,86	0,00000844	MCF-10a	30,91	30,05	0,86	1,81503831	
MCF7	20,84	20,45	20,88	20,49	20,67	42	42	42	42	-21,34	0,00000038	MCF7	32,02	30,6	1,42	2,67585511	
MDA-MB	21,80	21,53	21,71	21,61	21,66	30,83	30,41	31,12	30,7866667	-9,12	0,00179206	MDA-MB	32,70	30,18	2,52	5,73582099	
HOC7	23,95	22,97	23,79	24,13	23,71	42	42	42	42	-18,29	0,00000312	HOC7	31,88	33,75	-1,87	0,27357343	
OvMz	23,19	22,98	24,07	23,50	23,44	35,29	36,53	36,52	36,1133333	-12,68	0,00015256	OvMz	32,25	29,57	2,68	6,40855902	
A 431	23,20	24,88	25,76	24,43	24,57	35,63	34,97	38,44	36,3466667	-11,78	0,00028452	A 431	31,70	31,51	0,19	1,14076372	
HT1080	23,94	22,77	23,39	23,47	23,39	36,53	35,3	34,89	35,5733333	-12,18	0,00021538	HT1080	32,57	32,15	0,42	1,33792755	
HaCat	25,95	23,37	23,96	23,98	24,32	38,92	35,62	40,44	38,3266667	-14,01	0,00006054	HaCat	31,51	42	-10,49	0,00069534	

Anhang

ZNF671																
Ct-Werte PCR										Ct-Werte MSP						
Probe	Ct-Wert Expression									relative Expression		Probe	Ct-Wert Methylierung		relative Methylierung	
	HPRT 1	HPRT 2	HPRT 3	HPRT 4	HPRT Ø	ZNF671 1	ZNF671 2	ZNF671 3	ZNF671 Ø	DcT HKG-GOI	2^ΔDcT		ACTB Ø	ZNF671 Ø	DcT HKG-GOI	2^ΔDcT
C4-1	22,31	22,40	22,60	22,46	22,44	27,39	29,53	28,23	28,38	-5,94	0,01627912	C4-1	32,26	31,37	0,89	1,85317612
CaSki	21,95	21,96	21,91	22,08	21,98	42	33,51	32,77	36,0933333	-14,12	0,00005623	CaSki	31,53	31,67	-0,14	0,90751916
HeLa	21,47	21,06	21,05	21,03	21,15	42	33,25	37,94	37,73	-16,58	0,00001023	HeLa	32,95	33,53	-0,58	0,66896378
ME 180	21,34	21,09	21,83	21,00	21,32	28,56	29,81	28,51	28,96	-7,65	0,00499604	ME 180	33,84	33,81	0,03	1,02101213
MRI H 186	21,21	20,24	21,01	20,73	20,80	42	42	42	42	-21,20	0,00000041	MRI H 186	32,20	32,04	0,16	1,11728714
SiHa	22,51	22,37	22,90	22,79	22,64	42	28,36	27,89	32,75	-10,11	0,00090644	SiHa	32,06	31,47	0,59	1,50524675
SW 756	21,77	21,34	21,56	21,39	21,52	27,81	28,66	27,98	28,15	-6,64	0,01006158	SW 756	32,98	32,34	0,64	1,55832916
C33A	24,25	21,29	21,31	21,42	22,07	23,31	24,44	24,55	24,1	-2,03	0,24443114	C33A	31,40	42	-10,60	0,00064429
HPK-IA	23,29	23,58	22,93	23,01	23,20	26,54	27	26,46	26,6666667	-3,46	0,09061121	HPK-IA	32,43	42	-9,57	0,00131566
HPKII	22,94	22,59	22,34	22,30	22,54	26,57	27,36	27,23	27,0533333	-4,51	0,04386356	HPKII	32,03	42	-9,97	0,00099708
HpkIII	23,13	23,33	23,62	24,52	23,65	25,84	27,44	27,15	26,81	-3,16	0,11187813	HpkIII	31,84	42	-10,16	0,00087405
HpkV	22,67	21,72	22,30	23,21	22,48	30,19	31,38	29,91	30,4933333	-8,02	0,00385692	HpkV	31,82	42	-10,18	0,00086201
BT-474	23,29	23,67	23,63	23,92	23,63	27,59	29,72	29,66	28,99	-5,36	0,02430674	BT-474	30,66	36,01	-5,35	0,02451825
MCF-10a	24,54		24,56	24,58	24,56	29,1	31,19	30,94	30,41	-5,85	0,01733702	MCF-10a	30,91	30,95	-0,04	0,97265495
MCF7	20,96	20,07	20,22	20,42	20,42	29,34	31,16	29,82	30,1066667	-9,69	0,00121135	MCF7	32,02	37,94	-5,92	0,01651591
MDA-MB	20,98	20,66	20,95	20,63	20,81	26,83	26,5	26,47	26,6	-5,80	0,01801072	MDA-MB	32,70	34,57	-1,87	0,27357343
HOC7	23,06	22,02	22,79	22,33	22,55	25,04	26,76	26,52	26,1066667	-3,56	0,08498390	HOC7	31,88	30,9	0,98	1,97246541
OvMz	21,85	22,29	21,72	22,28	22,04	27,89	29,91	29,05	28,95	-6,92	0,00828662	OvMz	32,25	30,16	2,09	4,25748073
SK-OV-3	24,39	24,22	24,56	24,78	24,48	24,9783	25,2191	24,3918	24,8630667	-0,38	0,76936139	SK-OV-3	33,78	34,76	-0,98	0,50697974
A 431	21,45	23,61	23,76	23,64	23,12	28,45	30,9	30,51	29,9533333	-6,84	0,00873890	A 431	31,70	31,19	0,51	1,42405020
HT1080	22,25	22,32	22,24	22,02	22,21	26,18	26,07	26,02	26,09	-3,88	0,06780333	HT1080	32,57	42	-9,43	0,00144973
HaCat	24,58	23,01	22,70	23,21	23,38	28,43	30,13	29,63	29,3966667	-6,02	0,01539209	HaCat	31,51	42	-10,49	0,00069534

7.4 Tabellen zur Berechnung der relativen Expression und Methylierung der Gesamtgewebeproben

ASTN1													
Ct-Werte PCR													
Proben, die aus der Auswertung ausgeschlossen werden müssen, weil Konzentration zu gering ist													
Status	Ct-Wert Expression								relative Expression		Ct-Wert Methylierung		
	Sample ID	ACTB 1	ACTB 2	ACTB 3	ACTB Ø	ASTN1 1	ASTN1 2	ASTN1 Ø	DCt HKG-GOI	2 ^Δ DCt	ACTB Ø	ASTN1 Ø	DCt HKG-GOI
Normal-gewebe	2671 N	25,41	26,67	27,93	26,67	42,00	42,00	42,00	-15,33000000	0,00002428	35,16	42,00	-6,84500000
	2678 N	26,39	23,84	25,38	25,20	42,00	34,33	38,17	-12,96166667	0,00012536	38,02	42,00	-3,98000000
	2682 N	25,57	25,00	26,57	25,71	42,00	42,00	42,00	-16,28666667	0,0001251	29,83	42,00	-12,17500000
	2683 N	24,71	23,77	25,81	24,76	42,00	42,00	42,00	-17,23666667	0,00000648	34,02	42,00	-7,98000000
	2684 N	26,75	24,73	26,28	25,92	42,00	42,00	42,00	-16,08000000	0,0001444	35,26	42,00	-6,74000000
	5881 N	35,93	39,47	29,50	34,97						37,80	42,00	-4,20000000
	5882 N	36,98	42,00	29,05	36,01						35,56	42,00	-6,44000000
	5884 N	36,32	28,94	37,57	34,28						38,34	39,40	-1,06000000
	5886 N	33,77	32,50	32,02	32,76						35,98	42,00	-6,02000000
	5888 N	34,24	32,87	33,05	33,39						38,47	42,00	-3,53000000
	5889 N	36,59	33,68	31,45	33,91						35,81	42,00	-6,19000000
	5891 N	35,13	42,00	35,34	37,49						35,79	42,00	-6,21000000
	5892 N	33,89	33,66	33,71	33,75						37,43	42,00	-4,57000000
	5897 N	34,42	34,21	29,58	32,74						34,10	42,00	-7,90500000
	5901 N	33,88	35,83	31,37	33,69						36,51	42,00	-5,49000000
	5906 N	42,00	31,34	29,11	30,23						39,33	42,00	-2,67500000
	5908 N	38,77	36,78	34,35	36,63						35,95	42,00	-6,05000000
	5910 N	33,91	33,01	30,70	32,54						38,49	42,00	-3,51000000
	5912 N	42,00	31,54	32,74	32,14						39,20	42,00	-2,80000000
	5913 N	31,91	29,64	42,00	30,78						39,17	42,00	-2,83000000
CIN3	5916 N	39,56	33,79	32,34	35,23								
	5917 N	28,54	30,59	31,49	30,21								
	1499 T	24,83	42,00	22,83	23,83	36,77	34,66	35,72	-11,88500000	0,00026440	39,00	42,00	-3,00000000
	2055 T	24,20	42,00	24,34	24,27	42,00	42,00	42,00	-17,73000000	0,00000460	30,45	35,36	-4,91500000
	2062 T	24,85	23,09	24,51	24,15	42,00	42,00	42,00	-17,85000000	0,00000423	29,78	42,00	-12,22500000
	2451 T	24,64	23,22	24,63	24,16	42,00	42,00	42,00	-17,83666667	0,00000427	30,05	29,24	0,80500000
	2566 T	25,81	21,72	21,50	23,01	42,00	42,00	42,00	-18,99000000	0,00000192	30,78	37,07	-6,29500000
	2578 T	22,57	22,30	23,10	22,66	42,00	33,53	37,77	-15,10833333	0,00002831	31,18	32,80	-1,62000000
	3595 T	22,24	21,88	22,91	22,34	42,00	42,00	42,00	-19,65666667	0,00000121	31,41	30,64	0,76500000
	4198 T	25,77	20,50	22,15	22,81	42,00	42,00	42,00	-19,19333333	0,00000167	29,83	35,58	-5,75000000
	4225 T	23,99	21,67	22,01	22,56	42,00	42,00	42,00	-19,44333333	0,00000140	32,34	42,00	-9,66500000
	4372 T	24,11	19,62	21,23	21,65	38,65	42,00	40,33	-18,67166667	0,00000239	29,81	32,55	-2,74000000
	5107 T	25,47	42,00	23,43	24,45	35,85	33,06	34,46	-10,00500000	0,000097318	29,05	33,84	-4,79500000
	5405 T	23,46	22,61	24,37	23,48	42,00	34,80	38,40	-14,92000000	0,00003226	29,87	36,16	-6,29000000
	5410 T	25,51	24,92	26,33	25,59	42,00	42,00	42,00	-16,41333333	0,00000146	29,66	36,98	-7,32000000
	5413 T	26,64	42,00	24,17	25,41	42,00	35,22	38,61	-13,20500000	0,00010590	29,65	35,30	-5,64500000
	5414 T	26,93	42,00	25,15	26,04	42,00	42,00	42,00	-15,96000000	0,00001569	37,97	42,00	-4,03000000
	5420 T	28,42	30,18	42,00	29,30						38,82	42,00	-3,18000000
	5422 T A	24,09	42,00	26,17	25,13	42,00	42,00	42,00	-16,87000000	0,00000835	31,74	33,28	-1,54000000
CxCa	5423 T	42,00	19,97	21,40	20,69	42,00	42,00	42,00	-21,31500000	0,00000038			
	5427 T	21,71	20,89	21,96	21,52	37,94	42,00	39,97	-18,45000000	0,00000279	32,46	42,00	-9,54000000
	5431 T	24,46	42,00	24,38	24,42	42,00	35,54	38,77	-14,35000000	0,00004789	31,42	35,38	-3,96000000
	5432 T	23,11	42,00	24,43	23,77	42,00	35,63	38,82	-15,04500000	0,00002958	30,00	37,11	-7,11000000
	1509 T1b	21,09	21,51	24,45	22,35	42,00	42,00	42,00	-19,65000000	0,00000122	31,55	30,12	1,42500000
	2085 T1	24,15	21,60	23,60	23,12	36,53	34,91	35,72	-12,60333333	0,00016070	30,25	28,52	1,72500000
	2319 T2b	25,24	21,72	24,63	23,86	42,00	34,05	38,03	-14,16166667	0,00005456	30,43	28,49	1,94000000
	2707 T1	28,88	23,19	25,38	25,82	42,00	42,00	42,00	-16,18333333	0,00001344	30,41	31,59	-1,18000000
	2723 Ca	29,28	20,13	21,02	23,48	42,00	42,00	42,00	-18,52333333	0,00000265	34,83	32,17	2,66000000
	3256 T1	24,38	21,43	23,24	23,02	33,63	42,00	37,82	-14,79833333	0,00003510	29,83	28,85	0,98500000
	3719 T2b	42,00	21,73	23,93	22,83	42,00	42,00	42,00	-19,17000000	0,00000170	33,01	42,00	-8,99500000
	4112 T2b	25,93	19,88	21,70	22,50	42,00	42,00	42,00	-19,49666667	0,00000135	32,48	42,00	-9,52500000
	4112 T2c	22,04	21,07	22,47	21,86	42,00	42,00	42,00	-20,14000000	0,00000087	31,33	30,29	1,04000000
	4112 T2e	23,98	21,24	23,02	22,75	42,00	42,00	42,00	-19,25333333	0,00000160	31,29	29,52	1,77500000
	4338 T4c	26,04	26,32	27,37	26,58	42,00	35,35	38,68	-12,09833333	0,00022805	30,82	29,48	1,34000000
	4338 T4d	24,41	21,38	23,15	22,98	42,00	42,00	42,00	-19,02000000	0,00000188	31,18	31,53	-0,35500000
	4497 T2	25,34	21,76	23,62	23,57	42,00	42,00	42,00	-18,42666667	0,00000284	29,67	28,98	0,69000000
	4502 T	22,84	23,14	24,84	23,61	42,00	42,00	42,00	-18,39333333	0,00000290	33,94	36,24	-2,30000000
	4995 Tb	25,17	22,22	24,10	23,83	42,00	42,00	42,00	-18,17000000	0,00000339	31,05	32,72	-1,67000000
	5189 T2b	24,99	25,78	27,26	26,01	42,00	42,00	42,00	-15,99000000	0,00001536	30,33	42,00	-11,67500000
	5240 T4b	24,56	22,44	36,02	27,67						30,63	29,16	1,46500000
	5254 Tb	25,71	22,21	23,69	23,87	42,00	42,00	42,00	-18,13000000	0,00000349	30,51	29,19	1,32500000
	841 T3b	21,60	18,52	20,53	20,22	36,77	42,00	39,39	-19,16833333	0,00000170	30,42	32,83	-2,41000000
	892 T1d	25,31	19,23	21,19	21,91	42,00	42,00	42,00	-20,09000000	0,00000090	31,14	29,53	1,61000000
											30,73	33,53	-2,80000000

Anhang

NXPH1																
Ct-Werte PCR		Proben, die aus der Auswertung ausgeschlossen werden müssen, weil Konzentration zu gering ist														
Status	Ct-Wert Expression								relative Expression		Ct-Wert Methylierung				relative Methylierung	
	Sample ID	ACTB 1	ACTB 2	ACTB 3	ACTB Ø	NXPH1 1	NXPH1 2	NXPH1 Ø	DcT HKG-GOI	2 ^o DcT	ACTB Ø	NXPH1 Ø	DcT HKG-GOI	2 ^o DcT		
Normal-gewebe	2671 N	25,41	26,67	27,93	26,67	42,00	42,00	42,00	-15,33000000	0,00002428	35,16	42,00	-6,84500000	0,00869861		
	2678 N	26,39	23,84	25,38	25,20	42,00	42,00	42,00	-16,79666667	0,00000878	38,02	42,00	-3,98000000	0,06337247		
	2682 N	25,57	25,00	26,57	25,71	36,69	42,00	39,35	-13,63166667	0,00007879	29,83	42,00	-12,17500000	0,00021625		
	2683 N	24,71	23,77	25,81	24,76	42,00	42,00	42,00	-17,23666667	0,00000648	34,02	42,00	-7,98000000	0,00396078		
	2684 N	26,75	24,73	26,28	25,92	34,34	42,00	38,17	-12,25000000	0,00020530	35,26	42,00	-6,74000000	0,00935530		
	5881 N	35,93	39,47	29,50	34,97	39,78	42,00	40,89	-5,92333333	0,01647779	37,80	42,00	-4,20000000	0,05440941		
	5882 N	36,98	42,00	29,05	36,01	33,26	35,62	34,44	1,57000000	2,96904714	35,56	42,00	-6,44000000	0,01151773		
	5884 N	36,32	28,94	37,57	34,28	36,26	42,00	39,13	-4,85333333	0,03459402	38,34	42,00	-3,66000000	0,07910979		
	5886 N	33,77	32,50	32,02	32,76	33,19	36,69	34,94	-2,17666667	0,22118621	35,98	42,00	-6,02000000	0,01540989		
	5888 N	34,24	32,87	33,05	33,39	38,59	42,00	40,30	-6,90833333	0,00832500	38,47	42,00	-3,53000000	0,08656934		
	5889 N	36,59	33,68	31,45	33,91	34,43	37,01	35,72	-1,81333333	0,28453276	35,81	42,00	-6,19000000	0,01369696		
	5891 N	35,13	42,00	35,34	37,49	42,00	42,00				35,79	42,00	-6,21000000	0,01350839		
	5892 N	33,89	33,66	33,71	33,75	34,14	42,00	38,07	-4,31666667	0,05018268	37,43	42,00	-4,57000000	0,04210105		
	5897 N	34,42	34,21	29,58	32,74	35,88	34,47	35,18	-2,43833333	0,18449667	34,10	42,00	-7,90500000	0,00417213		
	5901 N	33,88	35,83	31,37	33,69	42,00	42,00				36,51	42,00	-5,49000000	0,02225078		
	5906 N	42,00	31,34	29,11	30,23	37,72	36,08	36,90	-6,67500000	0,00978644	39,33	42,00	-2,67500000	0,15658305		
	5908 N	38,77	36,78	34,35	36,63	42,00	42,00				35,95	42,00	-6,05000000	0,01509276		
	5910 N	33,91	33,01	30,70	32,54	42,00	42,00				38,49	42,00	-3,51000000	0,08777780		
	5912 N	42,00	31,54	32,74	32,14	35,01	42,00	38,51	-6,36500000	0,01213233	39,20	42,00	-2,80000000	0,14358729		
	5913 N	31,91	29,64	42,00	30,78	42,00	42,00				39,17	42,00	-2,83000000	0,14063231		
CIN3	5916 N	39,56	33,79	32,34	35,23	36,90	28,86	32,88	2,35000000	5,09824251						
	5917 N	28,54	30,59	31,49	30,21	36,56	42,00	39,28	-9,07333333	0,00185633	39,00	42,00	-3,00000000	0,12500000		
	1499 T	24,83	42,00	22,83	23,83	42,00	42,00	42,00	-18,17000000	0,00000339	30,45	37,20	-6,75000000	0,009290681		
	2055 T	24,20	42,00	24,34	24,27	34,56	42,00	38,28	-14,01000000	0,00006061	29,78	29,30	0,47500000	1,38991822		
	2062 T	24,85	23,09	24,51	24,15	38,30	36,98	37,64	-13,49000000	0,00008692	30,05	34,68	-4,63500000	0,040246301		
	2451 T	24,64	23,22	24,63	24,16	42,00	42,00	42,00	-17,83666667	0,00000427	30,78	31,79	-1,01000000	0,496546248		
	2566 T	25,81	21,72	21,50	23,01	36,41	33,39	34,90	-11,89000000	0,00026348	31,18	33,08	-1,90000000	0,267943366		
	2578 T	22,57	22,30	23,10	22,66	42,00	35,64	38,82	-16,16333333	0,00001363	31,41	30,03	1,38000000	2,602683711		
	3595 T	22,24	21,88	22,91	22,34	34,05	33,99	34,02	-11,67666667	0,00030547	29,83	30,70	-0,86500000	0,549046407		
	4198 T	25,77	20,50	22,15	22,81	32,05	31,73	31,89	-9,08333333	0,00184350	32,34	36,11	-3,77500000	0,073048578		
	4225 T	23,99	21,67	22,01	22,56	42,00	37,34	39,67	-17,11333333	0,00000705	29,81	30,23	-0,42500000	0,744838732		
	4372 T	24,11	19,62	21,23	21,65	42,00	42,00	42,00	-20,34666667	0,00000075	29,05	29,53	-0,48500000	0,71449707		
	5107 T	25,47	42,00	23,43	24,45	35,53	42,00	38,77	-14,31500000	0,00004906	29,87	34,12	-4,24500000	0,052738487		
	5405 T	23,46	22,61	24,37	23,48	42,00	42,00	42,00	-18,52000000	0,00000266	29,66	33,56	-3,90000000	0,066985841		
	5410 T	25,51	24,92	26,33	25,59	42,00	42,00	42,00	-16,41333333	0,00001146	29,65	32,89	-3,24000000	0,105843164		
	5413 T	26,64	42,00	24,17	25,41	38,90	42,00	40,45	-15,04500000	0,00029558	37,97	42,00	-4,03000000	0,061213769		
	5414 T	26,93	42,00	25,15	26,04	42,00	42,00	42,00	-15,96000000	0,00001569	38,82	35,61	3,21000000	9,253505471		
	5420 T	28,42	30,18	42,00	29,30						31,74	30,40	1,34500000	2,540301965		
	5422 T A	24,09	42,00	26,17	25,13	42,00	42,00	42,00	-16,87000000	0,00000835						
	5423 T	42,00	19,97	21,40	20,69	42,00	38,27	40,14	-19,45000000	0,00000140	5423 T	33,93	31,75000000	32,84		
5427 T	21,71	20,89	21,96	21,52	42,00	42,00	42,00	-20,48000000	0,00000068	31,42	32,09	-0,66500000	0,630688704			
5431 T	24,46	42,00	24,38	24,42	35,86	42,00	38,93	-14,51000000	0,00004286	30,00	34,01	-4,01500000	0,061853541			
5432 T	23,11	42,00	24,43	23,77	37,27	35,26	36,27	-12,49500000	0,00017323	31,55	29,33	2,22000000	4,658934346			
CxCa	1509 T1b	21,09	21,51	24,45	22,35	39,05	42,00	40,53	-18,17500000	0,00000338	30,25	28,05	2,19500000	4,578896642		
	2085 T1	24,15	21,60	23,60	23,12	36,89	35,46	36,18	-13,05833333	0,00011723	30,43	36,31	-5,88000000	0,016980232		
	2319 T2b	25,24	21,72	24,63	23,86	42,00	38,83	40,42	-16,55166667	0,00001041	30,41	30,01	0,39500000	1,31494276		
	2707 T1	28,88	23,19	25,38	25,82	42,00	42,00	42,00	-16,18333333	0,00001344	34,83	29,52	5,30500000	39,53339639		
	2723 Ca	29,28	20,13	21,02	23,48	42,00	30,24	36,12	-12,64333333	0,00015631	29,83	31,73	-1,89500000	0,268873598		
	3256 T1	24,38	21,43	23,24	23,02	36,41	42,00	39,21	-16,18833333	0,00001339	33,01	38,19	-5,18000000	0,027584469		
	3719 T2b	42,00	21,73	23,93	22,83	42,00	37,46	39,73	-16,90000000	0,00000818	32,48	30,36	2,11500000	4,331900182		
	4112 T2b	25,93	19,88	21,70	22,50	42,00	42,00	42,00	-19,49666667	0,00000135	31,33	29,59	1,74000000	3,340351678		
	4112 T2c	22,04	21,07	22,47	21,86	42,00	42,00	42,00	-20,14000000	0,00000087	31,29	35,24	-3,94500000	0,064928694		
	4112 T2e	23,98	21,24	23,02	22,75	30,10	42,00	36,05	-13,30333333	0,00009892	30,82	35,65	-4,82500000	0,035280138		
	4338 T4c	26,04	26,32	27,37	26,58	42,00	42,00	42,00	-15,42333333	0,00002276	31,18	34,24	-3,06500000	0,119493165		
	4338 T4d	24,41	21,38	23,15	22,98	42,00	42,00	42,00	-19,02000000	0,00000188	29,67	28,74	0,93500000	1,911890635		
	4497 T2	25,34	21,76	23,62	23,57	31,11	42,00	36,56	-12,98166667	0,00012363	33,94	42,00	-8,06000000	0,003747125		
	4502 T	22,84	23,14	24,84	23,61	42,00	42,00	42,00	-18,39333333	0,00000290	31,05	30,05	1,00000000	2		
	4995 Tb	25,17	22,22	24,10	23,83	42,00	33,04	37,52	-13,69000000	0,00007567	30,33	31,91	-1,58500000	0,333324669		
	5189 T2b	24,99	25,78	27,26	26,01	37,97	42,00	39,99	-13,97500000	0,00006210	30,63	36,30	-5,67500000	0,019572882		
	5240 T4b	24,56	22,44	36,02	27,67	42,00	38,11	40,06	-12,38166667	0,00018739	30,51	30,84	-0,33000000	0,795536484		
	5254 Tb	25,71	22,21	23,69	23,87	42,00	37,89	39,95	-16,07500000	0,00001449	30,42	31,06	-0,64500000	0,639492791		
	841 T3b	21,60	18,52	20,53	20,22	42,00	42,00	42,00	-21,78333333	0,00000028	31,14	30,07	1,06500000	2,09216988		
	892 T1d	25,31	19,23	21,19	21,91	36,23	42,00	39,12	-17,20500000	0,00000662	30,73	31,23	-0,49500000	0,709561678		

Anhang

SOX17		Proben, die aus der Auswertung ausgeschlossen werden müssen, weil Konzentration zu gering ist														
Ct-Werte PCR		Ct-Wert Expression							relative Expression		Ct-Wert Methylierung				relative Methylierung	
Status	Sample ID	ACTB 1	ACTB 2	ACTB 3	ACTB Ø	SOX17 1	SOX17 2	SOX17 Ø	DcT HKG-GOI	2 ^{DcT}	ACTB Ø	SOX17 Ø	DcT HKG-GOI	2 ^{DcT}		
Normal-gewebe	2671 N	25,41	26,67	27,93	26,67	42,00	42,00	42,00	-15,33000000	0,00002428	35,16	42,00	-6,84500000	0,00869861		
	2678 N	26,39	23,84	25,38	25,20	42,00	42,00	42,00	-16,79666667	0,00000878	38,02	42,00	-3,98000000	0,06337247		
	2682 N	25,57	25,00	26,57	25,71	42,00	33,04	37,52	-11,80666667	0,00027915	29,83	34,23	-4,40500000	0,04720227		
	2683 N	24,71	23,77	25,81	24,76	33,92	33,79	33,86	-9,09166667	0,00183289	34,02	38,81	-4,78500000	0,03627200		
	2684 N	26,75	24,73	26,28	25,92	42,00	42,00	42,00	-16,08000000	0,00001444	35,26	42,00	-6,74000000	0,00935530		
	5881 N	35,93	39,47	29,50	34,97						37,80	42,00	-4,20000000	0,05440941		
	5882 N	36,98	42,00	29,05	36,01						35,56	42,00	-6,44000000	0,01151773		
	5884 N	36,32	28,94	37,57	34,28						38,34	42,00	-3,66000000	0,07910979		
	5886 N	33,77	32,50	32,02	32,76						35,98	42,00	-6,02000000	0,01540989		
	5888 N	34,24	32,87	33,05	33,39	33,92	42,00	37,96	-4,57333333	0,04200389	38,47	42,00	-3,53000000	0,08656934		
	5889 N	36,59	33,68	31,45	33,91						35,81	42,00	-6,19000000	0,01369696		
	5891 N	35,13	42,00	35,34	37,49						35,79	42,00	-6,21000000	0,01350839		
	5892 N	33,89	33,66	33,71	33,75						37,43	42,00	-4,57000000	0,04210105		
	5897 N	34,42	34,21	29,58	32,74						34,10	42,00	-7,90500000	0,00417213		
	5901 N	33,88	35,83	31,37	33,69						36,51	42,00	-5,49000000	0,02225078		
	5906 N	42,00	31,34	29,11	30,23						39,33	42,00	-2,67500000	0,15658305		
	5908 N	38,77	36,78	34,35	36,63						35,95	42,00	-6,05000000	0,01509276		
	5910 N	33,91	33,01	30,70	32,54						38,49	42,00	-3,51000000	0,08777780		
	5912 N	42,00	31,54	32,74	32,14	42,00	35,04	38,52	-6,38000000	0,01200684	39,20	42,00	-2,80000000	0,14358729		
	5913 N	31,91	29,64	42,00	30,78						39,17	42,00	-2,83000000	0,14063231		
	5916 N	39,56	33,79	32,34	35,23											
	5917 N	28,54	30,59	31,49	30,21	33,88	42,00	37,94	-7,73333333	0,00469932	39,00	42,00	-3,00000000	0,12500000		
	CIN3	1499 T	24,83	42,00	22,83	23,83	30,75	29,46	30,11	-6,27500000	0,01291329	30,45	34,94	-4,49000000	0,044501569	
		2055 T	24,20	42,00	24,34	24,27	42,00	33,27	37,64	-13,36500000	0,00009478	29,78	30,92	-1,14000000	0,453759578	
		2062 T	24,85	23,09	24,51	24,15	31,78	30,65	31,22	-7,06500000	0,00746832	30,05	42,00	-11,95500000	0,000251876	
		2451 T	24,64	23,22	24,63	24,16	42,00	31,45	36,73	-12,56166667	0,00016541	30,78	33,69	-2,91500000	0,132585968	
2566 T		25,81	21,72	21,50	23,01	32,24	31,42	31,83	-8,82000000	0,00221266	31,18	42,00	-10,82000000	0,00053166		
2578 T		22,57	22,30	23,10	22,66	31,35	29,91	30,63	-7,97333333	0,00397912	31,41	36,96	-5,55500000	0,021270533		
3595 T		22,24	21,88	22,91	22,34	30,96	29,78	30,37	-8,02666667	0,00383471	29,83	37,43	-7,60000000	0,005154328		
4198 T		25,77	20,50	22,15	22,81	26,03	24,16	25,10	-2,28833333	0,00741187	32,34	42,00	-9,66500000	0,001231814		
4225 T		23,99	21,67	22,01	22,56	30,89	28,52	29,71	-7,14833333	0,00704916	29,81	37,20	-7,39000000	0,00596195		
4372 T		24,11	19,62	21,23	21,65	31,92	30,48	31,20	-9,54666667	0,00133711	29,05	36,78	-7,73000000	0,004710187		
5107 T		25,47	42,00	23,43	24,45	29,31	29,67	29,49	-5,04000000	0,03039547	29,87	36,35	-6,48000000	0,011202775		
5405 T		23,46	22,61	24,37	23,48	31,03	28,89	29,96	-6,48000000	0,01120278	29,66	32,95	-3,29000000	0,102237757		
5410 T		25,51	24,92	26,33	25,59	32,76	33,42	33,09	-7,50333333	0,00551152	29,65	30,86	-1,21000000	0,432268616		
5413 T		26,64	42,00	24,17	25,41	42,00	42,00	42,00	-16,59500000	0,00001010	37,97	38,29	-0,31500000	0,803850991		
5414 T		26,93	42,00	25,15	26,04	33,10	32,51	32,81	-6,76500000	0,00919458	38,82	37,55	-1,27500000	2,419988178		
5420 T		28,42	30,18	42,00	29,30	42,00	33,77	37,89	-8,58500000	0,00260410	31,74	32,32	-0,57500000	0,671286251		
5422 T A		24,09	42,00	26,17	25,13	31,57	30,96	31,27	-6,13500000	0,01422922						
5423 T		42,00	19,97	21,40	20,69	33,34	32,52	32,93	-12,24500000	0,00020601	32,46	36,39	-3,92500000	0,065835065		
5427 T		21,71	20,89	21,96	21,52	42,00	33,55	37,78	-16,25500000	0,00001279	31,42	31,72	-0,29500000	0,815072332		
5431 T		24,46	42,00	24,38	24,42	32,27	30,24	31,26	-6,83500000	0,00875911	30,00	33,29	-3,29500000	0,101884042		
5432 T	23,11	42,00	24,43	23,77	31,51	33,62	32,57	-8,79500000	0,00225134	31,55	28,32	3,22500000	9,350217988			
CxCa	1509 T1b	21,09	21,51	24,45	22,35	32,94	42,00	37,47	-15,12000000	0,00002808	30,25	27,43	2,81500000	7,037192607		
	2085 T1	24,15	21,60	23,60	23,12	31,86	30,32	31,09	-7,97333333	0,00397912	30,43	31,56	-1,12500000	0,458502022		
	2319 T2b	25,24	21,72	24,63	23,86	31,77	30,76	31,27	-7,40166667	0,00591393	30,41	29,35	1,06000000	2,084931522		
	2707 T1	28,88	23,19	25,38	25,82	32,60	32,81	32,71	-6,88833333	0,00844122	34,83	39,93	-5,10000000	0,029157281		
	2723 Ca	29,28	20,13	21,02	23,48	42,00	42,00	42,00	-18,52333333	0,00000265	29,83	27,01	2,82000000	7,06162397		
	3256 T1	24,38	21,43	23,24	23,02	32,43	31,70	32,07	-9,04833333	0,00188878	33,01	37,25	-4,24500000	0,052738487		
	3719 T2b	42,00	21,73	23,93	22,83	42,00	33,12	37,56	-14,73000000	0,00003680	32,48	42,00	-9,52500000	0,001357342		
	4112 T2b	25,93	19,88	21,70	22,50	33,51	34,24	33,88	-11,37166667	0,00037738	31,33	28,12	3,21500000	9,285631315		
	4112 T2c	22,04	21,07	22,47	21,86	33,11	31,88	32,50	-10,63500000	0,00062885	31,29	27,74	3,55500000	11,7534907		
	4112 T2e	23,98	21,24	23,02	22,75	31,56	33,64	32,60	-9,85333333	0,00108106	30,82	27,94	2,88000000	7,361501205		
	4338 T4c	26,04	26,32	27,37	26,58	33,96	30,79	32,38	-5,79833333	0,01796916	31,18	29,18	2,00000000	4		
	4338 T4d	24,41	21,38	23,15	22,98	42,00	30,46	36,23	-13,25000000	0,00010265	29,67	27,87	1,80000000	3,482202253		
	4497 T2	25,34	21,76	23,62	23,57	33,45	32,31	32,88	-9,30666667	0,00157912	33,94	42,00	-8,06000000	0,003747125		
	4502 T	22,84	23,14	24,84	23,61	42,00	34,38	38,19	-14,58333333	0,00004074	31,05	30,62	0,43000000	1,347233577		
	4995 Tb	25,17	22,22	24,10	23,83	32,45	30,10	31,28	-7,44500000	0,00573894	30,33	28,07	2,25500000	4,77342972		
	5189 T2b	24,99	25,78	27,26	26,01	31,70	32,66	32,18	-6,17000000	0,01388817	30,63	27,65	2,98000000	7,889861636		
	5240 T4b	24,56	22,44	36,02	27,67	33,03	33,98	33,51	-5,83166667	0,01755874	30,51	28,55	1,96000000	3,89061979		
	5254 Tb	25,71	22,21	23,69	23,87	32,74	31,09	31,92	-8,04500000	0,00378629	30,42	30,34	0,08000000	1,057018041		
	841 T3b	21,60	18,52	20,53	20,22	32,53	33,82	33,18	-12,95833333	0,00012565	31,14	28,23	2,91000000	7,516181994		
	892 T1d	25,31	19,23	21,19	21,91	31,47	34,52	33,00	-11,08500000	0,00046034	30,73	28,07	2,66500000	6,342273093		

Anhang

ZNF671																
Ct-Werte PCR		Proben, die aus der Auswertung ausgeschlossen werden müssen, weil Konzentration zu gering ist														
Status	Ct-Wert Expression								relative Expression		Ct-Wert Methylierung				relative Methylierung	
	Sample ID	ACTB 1	ACTB 2	ACTB 3	ACTB Ø	ZNF671 1	ZNF671 2	ZNF671 Ø	DcT HKG-GOI	2 ^{ΔDcT}	ACTB Ø	ZNF671 Ø	DcT HKG-GOI	2 ^{ΔDcT}		
Normal-gewebe	2671 N	25,41	26,67	27,93	26,67	42,00	42,00	42,00	-15,33000000	0,00002428	35,16	42,00	-6,84500000	0,00869861		
	2678 N	26,39	23,84	25,38	25,20	31,22	33,22	32,22	-7,01666667	0,00772277	38,02	42,00	-3,98000000	0,06337247		
	2682 N	25,57	25,00	26,57	25,71	31,90	33,72	32,81	-7,09666667	0,00730618	29,83	42,00	-12,17500000	0,00021625		
	2683 N	24,71	23,77	25,81	24,76	31,94	31,23	31,59	-6,82166667	0,00884044	34,02	42,00	-7,98000000	0,00396078		
	2684 N	26,75	24,73	26,28	25,92	33,77	34,28	34,03	-8,10500000	0,00363205	35,26	42,00	-6,74000000	0,00935530		
	5881 N	35,93	39,47	29,50	34,97						37,80	42,00	-4,20000000	0,05440941		
	5882 N	36,98	42,00	29,05	36,01						35,56	42,00	-6,44000000	0,01151773		
	5884 N	36,32	28,94	37,57	34,28						40,17	42,00	-1,83000000	0,28126462		
	5886 N	33,77	32,50	32,02	32,76						35,98	42,00	-6,02000000	0,01540989		
	5888 N	34,24	32,87	33,05	33,39						40,24	42,00	-1,76500000	0,29422668		
	5889 N	36,59	33,68	31,45	33,91						35,81	42,00	-6,19000000	0,01369696		
	5891 N	35,13	42,00	35,34	37,49						35,79	42,00	-6,21000000	0,01350839		
	5892 N	33,89	33,66	33,71	33,75						39,72	42,00	-2,28500000	0,20518540		
	5897 N	34,42	34,21	29,58	32,74						34,10	42,00	-7,90500000	0,00417213		
	5901 N	33,88	35,83	31,37	33,69						39,26	42,00	-2,74500000	0,14916697		
	5906 N	42,00	31,34	29,11	30,23						39,33	42,00	-2,67500000	0,15658305		
	5908 N	38,77	36,78	34,35	36,63						35,95	42,00	-6,05000000	0,01509276		
	5910 N	33,91	33,01	30,70	32,54						38,49	42,00	-3,51000000	0,08777780		
	5912 N	42,00	31,54	32,74	32,14						40,60	42,00	-1,40000000	0,37892914		
	5913 N	31,91	29,64	42,00	30,78						40,59	42,00	-1,41500000	0,37500975		
5916 N	39,56	33,79	32,34	35,23												
5917 N	28,54	30,59	31,49	30,21												
CIN3	1499 T	24,83	42,00	22,83	23,83	31,34	32,03	31,69	-7,85500000	0,00431926	30,45	39,98	-9,53500000	0,001347966		
	2055 T	24,20	42,00	24,34	24,27	33,66	35,33	34,50	-10,22500000	0,00083554	29,78	32,41	-2,63000000	0,161544104		
	2062 T	24,85	23,09	24,51	24,15	31,09	31,79	31,44	-7,29000000	0,00638986	30,05	32,35	-2,30500000	0,202360554		
	2451 T	24,64	23,22	24,63	24,16	33,21	32,41	32,81	-8,64666667	0,00249513	30,78	38,38	-7,60500000	0,005136495		
	2566 T	25,81	21,72	21,50	23,01	30,80	31,77	31,29	-8,27500000	0,00322832	31,18	34,60	-3,42000000	0,093428078		
	2578 T	22,57	22,30	23,10	22,66	30,75	31,08	30,92	-8,25833333	0,00326583	31,41	34,63	-3,22500000	0,106949378		
	3595 T	22,24	21,88	22,91	22,34	31,19	31,56	31,38	-9,03166667	0,00191072	29,83	32,57	-2,73500000	0,150204506		
	4198 T	25,77	20,50	22,15	22,81	26,27	26,58	26,43	-3,61833333	0,08142788	32,34	42,00	-9,66500000	0,001231814		
	4225 T	23,99	21,67	22,01	22,56	30,91	31,76	31,34	-8,77833333	0,00227750	29,81	35,21	-5,40000000	0,023683071		
	4372 T	24,11	19,62	21,23	21,65	30,67	31,92	31,30	-9,64166667	0,00125190	29,05	31,79	-2,74500000	0,149166968		
	5107 T	25,47	42,00	23,43	24,45	30,57	31,85	31,21	-6,76000000	0,00922651	29,87	42,00	-12,13000000	0,000223103		
	5405 T	23,46	22,61	24,37	23,48	31,54	31,79	31,67	-8,18500000	0,00343613	29,66	42,00	-12,34000000	0,000192881		
	5410 T	25,51	24,92	26,33	25,59	31,72	42,00	36,86	-11,27333333	0,00040401	29,65	36,37	-6,72000000	0,009485898		
	5413 T	26,64	42,00	24,17	25,41	42,00	33,89	37,95	-12,54000000	0,00016791	37,97	42,00	-4,03000000	0,061213769		
	5414 T	26,93	42,00	25,15	26,04	42,00	35,61	38,81	-12,76500000	0,00014367	38,82	42,00	-3,18000000	0,110337875		
	5420 T	28,42	30,18	42,00	29,30						31,74	40,47	-8,73000000	0,002355093		
	5422 T A	24,09	42,00	26,17	25,13	32,03	34,31	33,17	-8,04000000	0,00379943						
	5423 T	42,00	19,97	21,40	20,69	32,12	32,69	32,41	-11,72000000	0,00029643	32,46	42,00	-9,54000000	0,001343303		
	5427 T	21,71	20,89	21,96	21,52	31,72	34,46	33,09	-11,57000000	0,00032891	31,42	41,00	-9,57500000	0,001311106		
	5431 T	24,46	42,00	24,38	24,42	32,04	33,57	32,81	-8,38500000	0,00299132	30,00	42,00	-12,00500000	0,000243296		
5432 T	23,11	42,00	24,43	23,77	31,61	32,57	32,09	-8,32000000	0,00312918	31,55	34,22	-2,67500000	0,156583055			
CxCa	1509 T1b	21,09	21,51	24,45	22,35	31,50	32,47	31,99	-9,63500000	0,00125770	30,25	32,03	-1,78000000	0,291183397		
	2085 T1	24,15	21,60	23,60	23,12	30,23	33,08	31,66	-8,53833333	0,00268971	36,22	34,94	1,27500000	2,419988178		
	2319 T2b	25,24	21,72	24,63	23,86	30,81	32,50	31,66	-7,79166667	0,00451310	30,41	32,68	-2,27500000	0,20661258		
	2707 T1	28,88	23,19	25,38	25,82	42,00	42,00	42,00	-16,18333333	0,00001344	34,83	36,12	-1,29500000	0,407536166		
	2723 Ca	29,28	20,13	21,02	23,48	32,40	33,07	32,74	-9,25833333	0,00163292	29,83	32,41	-2,58000000	0,167240944		
	3256 T1	24,38	21,43	23,24	23,02	30,80	31,51	31,16	-8,13833333	0,00354909	33,01	33,76	-0,75500000	0,592546385		
	3719 T2b	42,00	21,73	23,93	22,83	32,39	42,00	37,20	-14,36500000	0,00004739	32,48	33,48	-1,00500000	0,498270131		
	4112 T2b	25,93	19,88	21,70	22,50	30,20	31,47	30,84	-8,33166667	0,00310398	31,33	33,03	-1,70000000	0,307786103		
	4112 T2c	22,04	21,07	22,47	21,86	31,02	31,48	31,25	-9,39000000	0,00149049	31,29	32,55	-1,25500000	0,418993567		
	4112 T2e	23,98	21,24	23,02	22,75	31,22	31,49	31,36	-8,60833333	0,00256232	30,82	32,17	-1,35000000	0,392292049		
	4338 T4c	26,04	26,32	27,37	26,58	32,89	32,08	32,49	-5,90833333	0,01665001	31,18	33,04	-1,86500000	0,274523203		
	4338 T4d	24,41	21,38	23,15	22,98	31,55	34,56	33,06	-10,07500000	0,00092709	29,67	31,10	-1,42500000	0,372419366		
	4497 T2	25,34	21,76	23,62	23,57	30,83	31,01	30,92	-7,34666667	0,00614374	37,97	42,00	-4,03000000	0,061213769		
	4502 T	22,84	23,14	24,84	23,61	42,00	34,34	38,17	-14,56333333	0,00004130	31,05	34,56	-3,51000000	0,087777805		
	4995 Tb	25,17	22,22	24,10	23,83	32,91	34,77	33,84	-10,01000000	0,00096982	30,33	33,31	-2,98500000	0,126306431		
	5189 T2b	24,99	25,78	27,26	26,01	33,07	36,24	34,66	-8,64500000	0,00249802	30,63	35,09	-4,46500000	0,045279442		
	5240 T4b	24,56	22,44	36,02	27,67	32,26	33,49	32,88	-5,20166667	0,02717330	30,51	32,93	-2,42000000	0,186856156		
	5254 Tb	25,71	22,21	23,69	23,87	33,04	33,03	33,04	-9,16500000	0,00174205	30,42	34,98	-4,56500000	0,042247214		
	841 T3b	21,60	18,52	20,53	20,22	31,89	31,00	31,45	-11,22833333	0,00041681	31,14	32,00	-0,86500000	0,549046407		
	892 T1d	25,31	19,23	21,19	21,91	42,00	42,00	42,00	-20,09000000	0,00000090	30,73	31,40	-0,67000000	0,628506687		

7.5 Tabellen zur Berechnung der relativen Expression und Methylierung der mikrodisektierten Gewebeproben

ASTN1										
Ct-Werte PCR		Proben, die aus der Auswertung ausgeschlossen werden müssen, weil Konzentration zu gering ist								
		Ct-Wert Expression		relative Expression			Ct-Wert Methylierung		relative Methylierung	
Status	Sample ID	ACTB	ASTN1	DCt HKG-ASTN1	2 ^{ΔDCt}		ACTB	ASTN1	DCt HKG-ASTN1	2 ^{ΔDCt}
Normal-gewebe	2655 N	32,20	34,56	-2,36	0,19479114		30,86	42	-11,14	0,00044312
	2657 N	31,70	34	-2,3	0,20306310		31,88	39,56	-7,68	0,00487629
	2659 N	29,01	31,65	-2,64	0,16042824		31,69	39,3	-7,61	0,00511872
	2660 N	30,15	34,39	-4,24	0,05292158		31,12	42	-10,88	0,00053063
	2661 N	33,21	34,7	-1,49	0,35601255		32,96	39,03	-6,07	0,01488497
	2664 N	32,20	37,83	-5,63	0,02019301		33,04	42	-8,96	0,00200803
	2665 N	32,76	32,8	-0,04	0,97265495		39,08	42	-2,92	0,13212726
	2668 N	39,36					32,24	42	-9,76	0,00115331
	2675 N	34,49	34,9	-0,41	0,75262337		32,06	39,26	-7,2	0,00680118
	2678 N	32,30	42	-9,7	0,00120229		33,01	42	-8,99	0,00196671
CIN3	2655 T	30,38	42	-11,62	0,00031771		33,07	42	-8,93	0,00205023
	2658 T	31,30	39,96	-8,66	0,00247218		31,06	42	-10,94	0,00050902
	2660 T	27,55	39,04	-11,49	0,00034767		27,66	37,53	-9,87	0,00106865
	2674 T	36,92					30,06	38,22	-8,16	0,00349619
	2683 T	32,00	39,88	-7,88	0,00424506		30,14	31,3	-1,16	0,44751254
	5411 T	30,88	37,11	-6,23	0,01332242		34,27	34,47	-0,2	0,87055056
	5414 T	34,18	34,39	-0,21	0,86453723		34,28	32,34	1,94	3,83705648
	5420 T	30,04	33,95	-3,91	0,06652314		34,51	38,19	-3,68	0,07802066
	5427 T	30,00	32,99	-2,99	0,12586944		34,72	42	-7,28	0,00643430
	5432 T	31,74	35,4	-3,66	0,07910979		34,45	34,73	-0,28	0,82359102
CxCa	841 T2a	23,18	30,63	-7,45	0,00571908		27,90	27,57	0,33	1,25701337
	892 T1	33,26	39,31	-6,05	0,01509276		25,29	32,11	-6,82	0,00885066
	1509 T1b	31,04	38,15	-7,11	0,00723897		28,43	26,4	2,03	4,08404850
	2319 T2b	22,29	35,83	-13,54	0,00008396		28,35	28,77	-0,42	0,74742462
	3719 T2a	26,19	34	-7,81	0,00445611		25,77	39	-13,23	0,00010408
	4112 T2b	28,87	33,39	-4,52	0,04358574		26,55	26,62	-0,07	0,95263800
	4338 T5b	22,31	42	-19,69	0,00000118					
	4806 T1b	27,48	38,56	-11,08	0,00046194		25,62	28,04	-2,42	0,18685616
	4822 T	27,97	42	-14,03	0,00005978		27,24	37,96	-10,72	0,00059287
	5240 T3a	27,41	32,62	-5,21	0,02701679		26,00	25,59	0,41	1,32868581

Anhang

NXPH1										
Ct-Werte PCR		Proben, die aus der Auswertung ausgeschlossen werden müssen, weil Konzentration zu gering ist								
		Ct-Wert Expression		relative Expression			Ct-Wert Methylierung		relative Methylierung	
Status	Sample ID	ACTB	NXPH1	DCt HKG-NXPH1	2^ΔDct		ACTB	NXPH1	DCt HKG-NXPH1	2^ΔDct
Normal-gewebe	2655 N	32,20	39,63	-7,43	0,00579892		30,86	42	-11,14	0,00044312
	2657 N	31,70	42	-10,3	0,00079322		31,88	42	-10,12	0,00089862
	2659 N	29,01	39,61	-10,6	0,00064429		31,69	42	-10,31	0,00078774
	2660 N	30,15	39,79	-9,64	0,00125335		31,12	42	-10,88	0,00053063
	2661 N	33,21	39,7	-6,49	0,01112539		32,96	42	-9,04	0,00189972
	2664 N	32,20	38	-5,8	0,01794841		33,04	42	-8,96	0,00200803
	2665 N	32,76	34,93	-2,17	0,22221067		39,08	42	-2,92	0,13212726
	2668 N	39,36	39,93	-0,57	0,67361679		32,24	42	-9,76	0,00115331
	2675 N	34,49	39,49	-5	0,03125000		32,06	42	-9,94	0,00101803
2678 N	32,30	39,16	-6,86	0,00860863		33,01	42	-8,99	0,00196671	
CIN3	2655 T	30,38	34,23	-3,85	0,06934809		33,07	34,95	-1,88	0,27168372
	2658 T	31,30	36,5	-5,2	0,02720471		31,06	29,40	1,66	3,16016525
	2660 T	27,55	39,5	-11,95	0,00025275		27,66	27,36	0,3	1,23114441
	2674 T	36,92	39,18	-2,26	0,20877198		30,06	38,80	-8,74	0,00233883
	2683 T	32,00	39,33	-7,33	0,00621513		30,14	29,12	1,02	2,02791896
	5411 T	30,88	36,09	-5,21	0,02701679		34,27	35,70	-1,43	0,37113089
	5414 T	34,18	42	-7,82	0,00442533		34,28	33,96	0,32	1,24833055
	5420 T	30,04	39,15	-9,11	0,00180974		34,51	34,67	-0,16	0,89502507
	5427 T	30,00	39,73	-9,73	0,00117755		34,72	36,16	-1,44	0,36856730
5432 T	31,74	39,74	-8	0,00390625		34,45	35,17	-0,72	0,60709744	
CxCa	841 T2a	23,18	39,04	-15,86	0,00001681		27,90	30,87	-2,97	0,12762652
	892 T1	33,26	39,57	-6,31	0,01260378		25,29	27,03	-1,74	0,29936968
	1509 T1b	31,04	39,29	-8,25	0,00328475		28,43	27,03	1,4	2,63901582
	2319 T2b	22,29	39,19	-16,9	0,00000818		28,35	29,05	-0,7	0,61557221
	3719 T2a	26,19	39,32	-13,13	0,00011155		25,77	27,70	-1,93	0,26242917
	4112 T2b	28,87	35,58	-6,71	0,00955188		26,55	28,63	-2,08	0,23651441
	4338 T5b	22,31	36,16	-13,85	0,00006772					
	4806 T1b	27,48	39,89	-12,41	0,00018375		25,62	27,60	-1,98	0,25348987
	4822 T	27,97	35,21	-7,24	0,00661520		27,24	37,38	-10,14	0,00088625
	5240 T3a	27,41	39,91	-12,5	0,00017263		26,00	25,29	0,71	1,63580412

Anhang

SOX17										
Ct-Werte PCR		Proben, die aus der Auswertung ausgeschlossen werden müssen, weil Konzentration zu gering ist								
		Ct-Wert Expression		relative Expression			Ct-Wert Methylierung		relative Methylierung	
Status	Sample ID	ACTB	SOX17	DCt HKG-SOX17	2 ^{-ΔCt}		ACTB	SOX17	DCt HKG-SOX17	2 ^{-ΔCt}
Normal-gewebe	2655 N	32,20	39,91	-7,71	0,00477594		30,86	42	-11,14	0,00044312
	2657 N	31,70	35,19	-3,49	0,08900314		31,88	42	-10,12	0,00089862
	2659 N	29,01	32,57	-3,56	0,08478777		31,69	42	-10,31	0,00078774
	2660 N	30,15	42	-11,85	0,00027089		31,12	42	-10,88	0,00053063
	2661 N	33,21	42	-8,79	0,00225916		32,96	42	-9,04	0,00189972
	2664 N	32,20	31,28	0,92	1,89211529		33,04	35,77	-2,73	0,15072598
	2665 N	32,76	35,50	-2,74	0,14968484		39,08	42	-2,92	0,13212726
	2668 N	39,36					32,24	42	-9,76	0,00115331
	2675 N	34,49	36,95	-2,46	0,18174656		32,06	42	-9,94	0,00101803
	2678 N	32,30	40,00	-7,7	0,00480916		33,01	42	-8,99	0,00196671
CIN3	2655 T	30,38	34,07	-3,69	0,07748173		33,07	42	-8,93	0,00205023
	2658 T	31,30	39,59	-8,29	0,00319493		31,06	28,08	2,98	7,88986164
	2660 T	27,55	34,06	-6,51	0,01097223		27,66	26,37	1,29	2,44528056
	2674 T	36,92					30,06	36,14	-6,08	0,01478215
	2683 T	32,00	34,31	-2,31	0,20166044		30,14	29,43	0,71	1,63580412
	5411 T	30,88	33,64	-2,76	0,14762408		34,27	35,57	-1,3	0,40612620
	5414 T	34,18	34,03	0,15	1,10956947		34,28	35,84	-1,56	0,33915108
	5420 T	30,04	38,15	-8,11	0,00361948		34,51	35,65	-1,14	0,45375958
	5427 T	30,00	42	-12	0,00024414		34,72	35,26	-0,54	0,68777091
	5432 T	31,74	34,23	-2,49	0,17800627		34,45	31,43	3,02	8,11167584
CxCa	841 T2a	23,18	31,93	-8,75	0,00232267		27,90	25,34	2,56	5,89707687
	892 T1	33,26	39,45	-6,19	0,01369696		25,29	26,24	-0,95	0,51763246
	1509 T1b	31,04	33,83	-2,79	0,14458602		28,43	25,16	3,27	9,64646262
	2319 T2b	22,29	37,10	-14,81	0,00003481		28,35	25,48	2,87	7,31065160
	3719 T2a	26,19	34,35	-8,16	0,00349619		25,77	38,73	-12,96	0,00012550
	4112 T2b	28,87	37,94	-9,07	0,00186062		26,55	24,97	1,58	2,98969850
	4338 T5b	22,31	31,76	-9,45	0,00142977					
	4806 T1b	27,48	33,58	-6,1	0,01457864		25,62	24,62	1	2,00000000
	4822 T	27,97	38,00	-10,03	0,00095647		27,24	42	-14,76	0,00003604
	5240 T3a	27,41	39,08	-11,67	0,00030689		26,00	23,61	2,39	5,24157362

Anhang

ZNF671											
Ct-Werte PCR		Proben, die aus der Auswertung ausgeschlossen werden müssen, weil Konzentration zu gering ist									
		Ct-Wert Expression		relative Expression			Ct-Wert Methylierung		relative Methylierung		
Status	Sample ID	ACTB	ZNF671	DCt HKG-ZNF671	2 ^Δ DCt		ACTB	ZNF671	DCt HKG-ZNF671	2 ^Δ DCt	
Normal-gewebe	2655 N	32,20	42	-9,80	0,00112178		30,86	35,8	-4,94	0,03257706	
	2657 N	31,70	42	-10,3	0,00079322		31,88	42	-10,12	0,00089862	
	2659 N	29,01	35,18	-6,17	0,01388817		31,69	42	-10,31	0,00078774	
	2660 N	30,15	42	-11,85	0,00027089		31,12	37,69	-6,57	0,01052526	
	2661 N	33,21	39,99	-6,78	0,00909948		32,96	37,05	-4,09	0,05872017	
	2664 N	32,20	42	-9,8	0,00112178		33,04	42	-8,96	0,00200803	
	2665 N	32,76	42	-9,24	0,00165380		39,08	42	-2,92	0,13212726	
	2668 N	39,36					32,24	42	-9,76	0,00115331	
	2675 N	34,49	33,54	0,95	1,93187266		32,06	42	-9,94	0,00101803	
	2678 N	32,30	42	-9,7	0,00120229		33,01	34,95	-1,94	0,26061644	
CIN3	2655 T	30,38	42	-11,62	0,00031771		33,07	38,02	-4,95	0,03235203	
	2658 T	31,30	42	-10,7	0,00060114		31,06	26,39	4,67	25,45716748	
	2660 T	27,55	39,5	-11,95	0,00025275		27,66	27,15	0,51	1,42405020	
	2674 T	36,92					30,06	36,64	-6,58	0,01045256	
	2683 T	32,00	39,82	-7,82	0,00442533		30,14	27,08	3,06	8,33972609	
	5411 T	30,88	39,49	-8,61	0,00255936		34,27	39,77	-5,5	0,02209709	
	5414 T	34,18	42	-7,82	0,00442533		34,28	29,49	4,79	27,66519140	
	5420 T	30,04	39,25	-9,21	0,00168855		34,51	34,89	-0,38	0,76843759	
	5427 T	30,00	42	-12	0,00024414		34,72	42	-7,28	0,00643430	
	5432 T	31,74	35,17	-3,43	0,09278272		34,45	32,49	1,96	3,89061979	
CxCa	841 T2a	23,18	33,97	-10,79	0,00056479		27,90	24,4	3,5	11,31370850	
	892 T1	33,26	39,4	-6,14	0,01417999		25,29	24,98	0,31	1,23970770	
	1509 T1b	31,04	39,26	-8,22	0,00335377		28,43	25,81	2,62	6,14750073	
	2319 T2b	22,29	39,29	-17	0,00000763		28,35	25,15	3,2	9,18958684	
	3719 T2a	26,19	39,93	-13,74	0,00007309		25,77	26,19	-0,42	0,74742462	
	4112 T2b	28,87	42	-13,13	0,00011155		26,55	24,41	2,14	4,40762046	
	4338 T5b	22,31	42	-19,69	0,00000118						
	4806 T1b	27,48	42	-14,52	0,00004256		25,62	25,34	0,28	1,21419488	
	4822 T	27,97	42	-14,03	0,00005978		27,24	37,81	-10,57	0,00065783	
	5240 T3a	27,41	42	-14,59	0,00004055		26,00	24,46	1,54	2,90794503	

7.6 Sequenzierergebnisse ZNF671-001 im pCDH-Vektor

Sequenzierergebnis: Primer 129 pCDH F

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	1960 bits(1061)	0.0	1069/1075(99%)	0/1075(0%)	Plus/Plus	
Query	1	ATGTTGTCCCCAGTGTCCCAGACGCGTCTGATGCTCTGCAGGGACGGAAGTGCCTGCGT	60			
Sbjct	3	ATGNTGTCCCCAGTGTCCCAGACGCGTCTGATGCTCTGCAGGGACGGAAGTGCCTGCGT	62			
Query	61	CCCCGATCGAGACGCCTGCCGCTCCCGGCAGCTGTCCGCGCCACGGTCTATGGCGGAG	120			
Sbjct	63	CCCCGATCGAGACGCCTGCCGCTCCCGGCAGCTGTCCGCGCCACGGTCTATGGCGGAG	122			
Query	121	CTAACGGACTCCGCGCGGGGCTGTGTGGTCTTTGAGGATGTGTTTGTATACTTCTCTCGG	180			
Sbjct	123	CTAACGGACTCCGCGCGGGGCTGTGTGGTCTTTGAGGATGTGTTTGTATACTTCTCTCGG	182			
Query	181	GAAGAATGGGAGCTTCTTGATGATGCTCAGAGACTTTTGTACCATGATGTGATGCTGGAG	240			
Sbjct	183	GAAGAATGGGAGCTTCTTGATGATGCTCAGAGACTTTTGTACCATGATGTGATGCTGGAG	242			
Query	241	AACTTTGCACTTTTAGCCTCACTGGGAATTGCATTTTCCAGATCACGTGCAGTCATGAAA	300			
Sbjct	243	AACTTTGCACTTTTAGCCTCACTGGGAATTGCATTTTCCAGATCACGTGCAGTCATGAAA	302			
Query	301	CTAGAGCGAGGAGAAGAGCCCTGGGTGTATGACCAGGTGGATATGACTTCAGCCACAGAA	360			
Sbjct	303	CTAGAGCGAGGAGAAGAGCCCTGGGTGTATGACCAGGTGGATATGACTTCAGCCACAGAA	362			
Query	361	AGAGAGGCCCCAGAGGGGACTTAGACCTGGTTGTTGGCATGGAGTGGAGGATGAAGAGGTA	420			
Sbjct	363	AGAGAGGCCCCAGAGGGGACTTAGACCTGGTTGTTGGCATGGAGTGGAGGATGAAGAGGTA	422			
Query	421	TCTTCTGAGCAGAGCATTTTTGTAGCAGGAGTGTGAGAGGTGAGGACTCTCATGGCAGAG	480			
Sbjct	423	TCTTCTGAGCAGAGCATTTTTGTAGCAGGAGTGTGAGAGGTGAGGACTCTCATGGCAGAG	482			
Query	481	CTGGAGTCTCACCCATGTGACATATGTGGCCCAATATTGAAAGATACCTTACACCTGGCT	540			
Sbjct	483	CTGGAGTCTCACCCATGTGACATATGTGGCCCAATATTGAAAGATACCTTACACCTGGCT	542			
Query	541	AAATACCATGGGGGAAAAGCCAGGCAGAAACCATACTTGTGTGGGGCATGTGAAAGCAA	600			
Sbjct	543	AAATACCATGGGGGAAAAGCCAGGCAGAAACCATACTTGTGTGGGGCATGTGAAAGCAA	602			
Query	601	TTCTGGTTTCAGTACAGACTTTGACCAGCACCAGAACCCAGCCCAATGGAGGGAAACTTTTC	660			
Sbjct	603	TTCTGGTTTCAGTACAGACTTTGACCAGCACCAGAACCCAGCCCAATGGAGGGAAACTTTTC	662			
Query	661	CCAAGGAAGGAGGGCAGAGACTCTGTGAAAAGCTGCAGAGTCCATGTGCCAGAGAAGACC	720			
Sbjct	663	CCAAGGAAGGAGGGCAGAGACTCTGTGAAAAGCTGCAGAGTCCATGTGCCAGAGAAGACC	722			
Query	721	CTCACATGTGGGAAAGGTAGGAGAGACTTTTCAGCCACATCTGGCCTTCTTCAGCATCAG	780			
Sbjct	723	CTCACATGTGGGAAAGGTAGGAGAGACTTTTCAGCCACATCTGGCCTTCTTCAGCATCAG	782			
Query	781	GCCTCTCTCAGCAGCATGAAGCCCCACAAGAGCACTAAGCTTGTGAGTGGCTTTCTCATG	840			
Sbjct	783	GCCTCTCTCAGCAGCATGAAGCCCCACAAGAGCACTAAGCTTGTGAGTGGCTTTCTCATG	842			

Anhang

```

Query   841 GGACAGAGGTATCACAGGTGTGGTGAATGTGGGAAAGCCTTCACCCGCAAAGACACACTT 900
      |||
Sbjct   843 GGACAGAGGTATCACAGGTGTGGTGAATGTGGGAAAGCCTTCACCCGCAAAGACACACTT 902

Query   901 GCTCGGCATCAGAGAATCCACACTGGAGAAAGGCCTTATGAGTGTAAACGAATGTGGGAAA 960
      |||
Sbjct   903 GCTCGGCATCAGAGAATCCACACTGGAGAAAGGCCTTATGAGTGTAAACGAATGTGGGAAA 962

Query   961 TTCTTCAGCCAAAGCTATGACCTCTTTAAACACCAGACAGTTCACACTGGAGAAAGGCCA1020
      |||
Sbjct   963 TTCTTCAGCCAAAGCTATGACCTCTTTAAACACCAGACAGTTCAMACTGGAAAAAGGCCW1022

Query   1021 TACGAGTGCAGCGAATGTGGGAAATTCTTTAGACAAATCTCCGGCCTGATTGAGC 1075
      |||
Sbjct   1023 TACGAGTGCAGCGAATGTGGGAAATTCTTTAAACAAATCTCCGGCCTGATTGAGC 1077

```

Sequenzierergebnis: Primer 130 pCDH R

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
2063 bits(1117) 0.0 1117/1117(100%) 0/1117(0%) Plus/Minus						
Query	501		CATATGTGGCCCAATATTGAAAGATACCTTACACCTGGCTAAATACCATGGGGGAAAAGC			560
Sbjct	1117		CATATGTGGCCCAATATTGAAAGATACCTTACACCTGGCTAAATACCATGGGGGAAAAGC			1058
Query	561		CAGGCAGAAACCATACTTGTGTGGGGCATGTGGAAAGCAATTCTGGTTCAGTACAGACTT			620
Sbjct	1057		CAGGCAGAAACCATACTTGTGTGGGGCATGTGGAAAGCAATTCTGGTTCAGTACAGACTT			998
Query	621		TGACCAGCACCAGAACCAGCCCAATGGAGGGAAACTTTTCCCAAGGAAGGAGGGCAGAGA			680
Sbjct	997		TGACCAGCACCAGAACCAGCCCAATGGAGGGAAACTTTTCCCAAGGAAGGAGGGCAGAGA			938
Query	681		CTCTGTGAAAAGCTGCAGAGTCCATGTGCCAGAGAAGACCCTCACATGTGGGAAAGGTAG			740
Sbjct	937		CTCTGTGAAAAGCTGCAGAGTCCATGTGCCAGAGAAGACCCTCACATGTGGGAAAGGTAG			878
Query	741		GAGAGACTTTTCAGCCACATCTGGCCTTCTTCAGCATCAGGCCTCTCTCAGCAGCATGAA			800
Sbjct	877		GAGAGACTTTTCAGCCACATCTGGCCTTCTTCAGCATCAGGCCTCTCTCAGCAGCATGAA			818
Query	801		GCCCCACAAGAGCACTAAGCTTGTGAGTGGCTTTCTCATGGGACAGAGGTATCACAGGTG			860
Sbjct	817		GCCCCACAAGAGCACTAAGCTTGTGAGTGGCTTTCTCATGGGACAGAGGTATCACAGGTG			758
Query	861		TGGTGAATGTGGGAAAGCCTTCACCCGCAAAGACACACTTGCTCGGCATCAGAGAATCCA			920
Sbjct	757		TGGTGAATGTGGGAAAGCCTTCACCCGCAAAGACACACTTGCTCGGCATCAGAGAATCCA			698
Query	921		CACTGGAGAAAGGCCTTATGAGTGTAAACGAATGTGGGAAATTCTTCAGCCAAAGCTATGA			980
Sbjct	697		CACTGGAGAAAGGCCTTATGAGTGTAAACGAATGTGGGAAATTCTTCAGCCAAAGCTATGA			638
Query	981		CCTCTTTAAACACCAGACAGTTCACACTGGAGAAAGGCCATACGAGTGCAGCGAATGTGG			1040
Sbjct	637		CCTCTTTAAACACCAGACAGTTCACACTGGAGAAAGGCCATACGAGTGCAGCGAATGTGG			578
Query	1041		GAAATTCTTTAGACAAATCTCCGGCCTGATTGAGCACAGGCGAGTTCACACGGGTGAAAG			1100
Sbjct	577		GAAATTCTTTAGACAAATCTCCGGCCTGATTGAGCACAGGCGAGTTCACACGGGTGAAAG			518
Query	1101		ACTCTATCAGTGTGGCAAATGTGGGAAATTTTTTAGCAGTAAGTCTAATCTCATTCGACA			1160
Sbjct	517		ACTCTATCAGTGTGGCAAATGTGGGAAATTTTTTAGCAGTAAGTCTAATCTCATTCGACA			458

Anhang

Query	1161	CCAGGAAGTTCACACAGGAGCCAGGCCTTATGTATGCAGCGAATGTGGGAAAGAGTTCAG	1220
Sbjct	457	CCAGGAAGTTCACACAGGAGCCAGGCCTTATGTATGCAGCGAATGTGGGAAAGAGTTCAG	398
Query	1221	TCGGAAACACACACTTGTCTGCACCAACGAACTCACACTGGAGAAAGGCCTTATGAGTG	1280
Sbjct	397	TCGGAAACACACACTTGTCTGCACCAACGAACTCACACTGGAGAAAGGCCTTATGAGTG	338
Query	1281	CAGTGAATGTGGGAAGGCCTTTAGCCAAAGCTCCACCTTAATGTACACTGGAGAATTCA	1340
Sbjct	337	CAGTGAATGTGGGAAGGCCTTTAGCCAAAGCTCCACCTTAATGTACACTGGAGAATTCA	278
Query	1341	CAGCAGTGATTATGAGTGTAGCAGATGTGGTAAAGCTTTCAGCTGCATCTCCAAACTCAT	1400
Sbjct	277	CAGCAGTGATTATGAGTGTAGCAGATGTGGTAAAGCTTTCAGCTGCATCTCCAAACTCAT	218
Query	1401	TCAGCACCAGAAAGTTCACCTCTGGAGAAAAGCCTTATGAGTGCAGCAAGTGCGGGAAAGC	1460
Sbjct	217	TCAGCACCAGAAAGTTCACCTCTGGAGAAAAGCCTTATGAGTGCAGCAAGTGCGGGAAAGC	158
Query	1461	CTTCACTCAAAGACCCAAACCTCATCAGGCACTGGAAAGTCCACACTGGGGAAAGGCCTTA	1520
Sbjct	157	CTTCACTCAAAGACCCAAACCTCATCAGGCACTGGAAAGTCCACACTGGGGAAAGGCCTTA	98
Query	1521	TGTGTGTAGTGAGTGCGGGAGAGAATTCATCCGGAACAGACACTTGTCTGCACCAGAG	1580
Sbjct	97	TGTGTGTAGTGAGTGCGGGAGAGAATTCATCCGGAACAGACACTTGTCTGCACCAGAG	38
Query	1581	GGTTCATGCTGGAGAAAAGCTTTAAGAGTGTAGCAAA	1617
Sbjct	37	GGTTCATGCTGGAGAAAAGCTTTAAGAGTGTAGCAAA	1

Sequenzierergebnis: Primer 3097-ZNF671seqF

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	1485 bits(804)	0.0	804/804(100%)	0/804(0%)	Plus/Plus	
Query	819		GCTTGTGAGTGGCTTTCTCATGGGACAGAGGTATCACAGGTGTGGTGAATGTGGGAAAGC			878
Sbjct	2		GCTTGTGAGTGGCTTTCTCATGGGACAGAGGTATCACAGGTGTGGTGAATGTGGGAAAGC			61
Query	879		CTTCAACCCGCAAAGACACACTTGCTCGGCATCAGAGAATCCACACTGGAGAAAGGCCTTA			938
Sbjct	62		CTTCAACCCGCAAAGACACACTTGCTCGGCATCAGAGAATCCACACTGGAGAAAGGCCTTA			121
Query	939		TGAGTGTAAACGAATGTGGGAAATTCTTCAGCCAAAGCTATGACCTCTTTAAACACCAGAC			998
Sbjct	122		TGAGTGTAAACGAATGTGGGAAATTCTTCAGCCAAAGCTATGACCTCTTTAAACACCAGAC			181
Query	999		AGTTCACACTGGAGAAAGGCCATACGAGTGCAGCGAATGTGGGAAATTCTTTAGACAAAT			1058
Sbjct	182		AGTTCACACTGGAGAAAGGCCATACGAGTGCAGCGAATGTGGGAAATTCTTTAGACAAAT			241
Query	1059		CTCCGGCCTGATTGAGCACAGGCGAGTTCACACGGGTGAAAGACTCTATCAGTGTGGCAA			1118
Sbjct	242		CTCCGGCCTGATTGAGCACAGGCGAGTTCACACGGGTGAAAGACTCTATCAGTGTGGCAA			301
Query	1119		ATGTGGGAAATTTTTTAGCAGTAAGTCTAATCTCATTCGACACCAGGAAGTTCACACAGG			1178
Sbjct	302		ATGTGGGAAATTTTTTAGCAGTAAGTCTAATCTCATTCGACACCAGGAAGTTCACACAGG			361
Query	1179		AGCCAGGCCTTATGTATGCAGCGAATGTGGGAAAGAGTTCAGTCGGAAACACACACTTGT			1238
Sbjct	362		AGCCAGGCCTTATGTATGCAGCGAATGTGGGAAAGAGTTCAGTCGGAAACACACACTTGT			421

Anhang

Query	1239	TCTGCACCAACGAACTCACACTGGAGAAAGGCCTTATGAGTGCAGTGAATGTGGGAAGGC	1298
Sbjct	422	TCTGCACCAACGAACTCACACTGGAGAAAGGCCTTATGAGTGCAGTGAATGTGGGAAGGC	481
Query	1299	CTTTAGCCAAAGCTCCCACCTTAATGTACACTGGAGAATTCACAGCAGTGATTATGAGTG	1358
Sbjct	482	CTTTAGCCAAAGCTCCCACCTTAATGTACACTGGAGAATTCACAGCAGTGATTATGAGTG	541
Query	1359	TAGCAGATGTGGTAAAGCTTTCAGCTGCATCTCCAAACTCATTCAGCACCAGAAAGTTCA	1418
Sbjct	542	TAGCAGATGTGGTAAAGCTTTCAGCTGCATCTCCAAACTCATTCAGCACCAGAAAGTTCA	601
Query	1419	CTCTGGAGAAAAGCCTTATGAGTGCAGCAAGTGCGGGAAAGCCTTCACTCAAAGACCCAA	1478
Sbjct	602	CTCTGGAGAAAAGCCTTATGAGTGCAGCAAGTGCGGGAAAGCCTTCACTCAAAGACCCAA	661
Query	1479	CCTCATCAGGCACTGGAAAGTCCACACTGGGGAAAGGCCTTATGTGTGTAGTGAAGTGC	1538
Sbjct	662	CCTCATCAGGCACTGGAAAGTCCACACTGGGGAAAGGCCTTATGTGTGTAGTGAAGTGC	721
Query	1539	GAGAGAATTCATCCGAAACAGACACTTGTCTGCACCAGAGGGTTCATGCTGGAGAAAA	1598
Sbjct	722	GAGAGAATTCATCCGAAACAGACACTTGTCTGCACCAGAGGGTTCATGCTGGAGAAAA	781
Query	1599	GCTTTAAGAGTGTAGCAAATGTGG	1622
Sbjct	782	GCTTTAAGAGTGTAGCAAATGTGG	805

Sequenzierergebnis: Primer 3098- ZNF671seqR

	Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
	1700 bits(920)	0.0	923/924(99%)	1/924(0%)	Plus/Minus	
Query	1	ATGTTGT-CCCCAGTGTCCCCGAGACGCGTCTGATGCTCTGCAGGGACGGAAGTGCCTGCG				59
Sbjct	924	ATGTTGTCCCCAGTGTCCCCGAGACGCGTCTGATGCTCTGCAGGGACGGAAGTGCCTGCG				865
Query	60	TCCCCGATCGAGACGCCTGCCGCTCCCGGCAGCTGTCCGCGCCACGGTCTATGGCGGA				119
Sbjct	864	TCCCCGATCGAGACGCCTGCCGCTCCCGGCAGCTGTCCGCGCCACGGTCTATGGCGGA				805
Query	120	GCTAACGGACTCCGCGCGGGGCTGTGTGGTCTTTGAGGATGTGTTGTATACCTCTCTCG				179
Sbjct	804	GCTAACGGACTCCGCGCGGGGCTGTGTGGTCTTTGAGGATGTGTTGTATACCTCTCTCG				745
Query	180	GGAAGAATGGGAGCTTCTTGATGATGCTCAGAGACTTTTGTACCATGATGTGATGCTGGA				239
Sbjct	744	GGAAGAATGGGAGCTTCTTGATGATGCTCAGAGACTTTTGTACCATGATGTGATGCTGGA				685
Query	240	GAACCTTTGCACTTTTAGCCTCACTGGGAATTGCATTTTCCAGATCACGTGCAGTCATGAA				299
Sbjct	684	GAACCTTTGCACTTTTAGCCTCACTGGGAATTGCATTTTCCAGATCACGTGCAGTCATGAA				625
Query	300	ACTAGAGCGAGGAGAAGAGCCCTGGGTGTATGACCAGGTGGATATGACTTCAGCCACAGA				359
Sbjct	624	ACTAGAGCGAGGAGAAGAGCCCTGGGTGTATGACCAGGTGGATATGACTTCAGCCACAGA				565
Query	360	AAGAGAGGCCCCAGAGGGGACTTAGACCTGGTTGTTGGCATGGAGTGGAGGATGAAGAGGT				419
Sbjct	564	AAGAGAGGCCCCAGAGGGGACTTAGACCTGGTTGTTGGCATGGAGTGGAGGATGAAGAGGT				505
Query	420	ATCTTCTGAGCAGAGCATTTTTTGTAGCAGGAGTGTGAGAGTTCAGGACTCTCATGGCAGA				479
Sbjct	504	ATCTTCTGAGCAGAGCATTTTTTGTAGCAGGAGTGTGAGAGTTCAGGACTCTCATGGCAGA				445
Query	480	GCTGGAGTCTCACCCTATGTGACATATGTGGCCCAATATTGAAAGATACCTTACACCTGGC				539

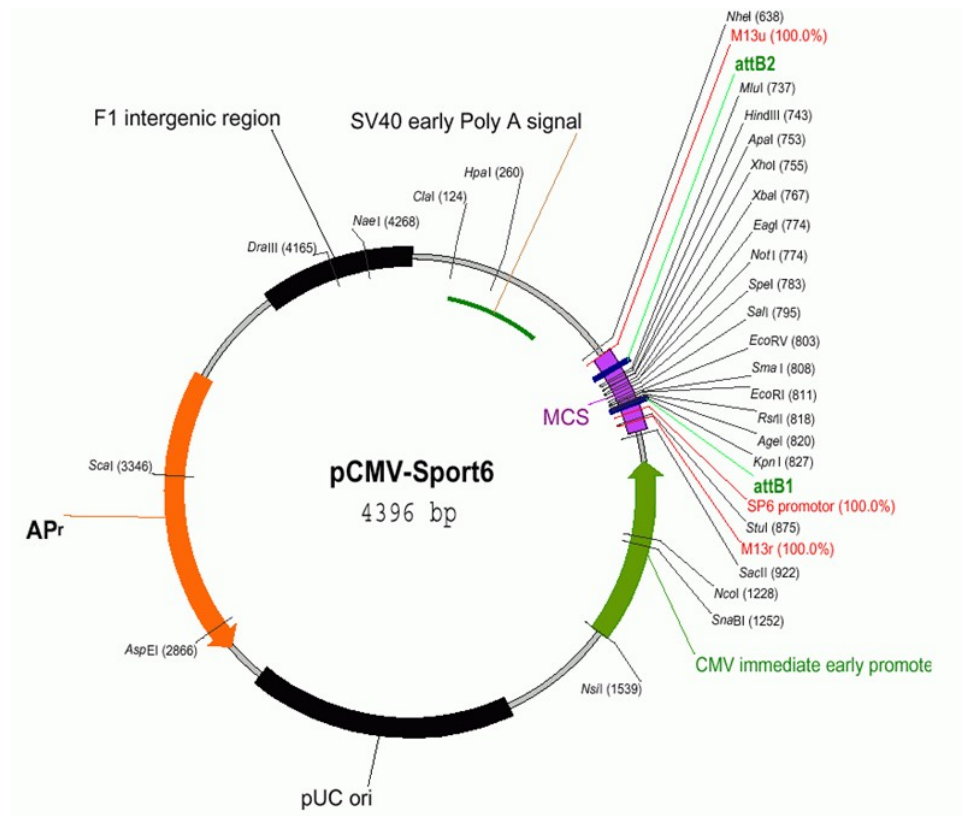
Anhang

Sbjct	444	 GCTGGAGTCTCACCCATGTGACATATGTGGCCCAATATTGAAAGATACCTTACACCTGGC	385
Query	540	TAAATACCATGGGGGAAAAGCCAGGCAGAAACCATACTTGTGTGGGGCATGTGGAAAGCA	599
Sbjct	384	 TAAATACCATGGGGGAAAAGCCAGGCAGAAACCATACTTGTGTGGGGCATGTGGAAAGCA	325
Query	600	ATTCTGGTTCAGTACAGACTTTGACCAGCACCAGAACCAGCCCAATGGAGGGAACTTTT	659
Sbjct	324	 ATTCTGGTTCAGTACAGACTTTGACCAGCACCAGAACCAGCCCAATGGAGGGAACTTTT	265
Query	660	CCCAAGGAAGGAGGGCAGAGACTCTGTGAAAAGCTGCAGAGTCCATGTGCCAGAGAAGAC	719
Sbjct	264	 CCCAAGGAAGGAGGGCAGAGACTCTGTGAAAAGCTGCAGAGTCCATGTGCCAGAGAAGAC	205
Query	720	CCTCACATGTGGGAAAGGTAGGAGAGACTTTTCAGCCACATCTGGCCTTCTTCAGCATCA	779
Sbjct	204	 CCTCACATGTGGGAAAGGTAGGAGAGACTTTTCAGCCACATCTGGCCTTCTTCAGCATCA	145
Query	780	GGCCTCTCTCAGCAGCATGAAGCCCCACAAGAGCACTAAGCTTGTGAGTGGCTTTCTCAT	839
Sbjct	144	 GGCCTCTCTCAGCAGCATGAAGCCCCACAAGAGCACTAAGCTTGTGAGTGGCTTTCTCAT	85
Query	840	GGGACAGAGGTATCACAGGTGTGGTGAATGTGGGAAAGCCTTCACCCGCAAAGACACACT	899
Sbjct	84	 GGGACAGAGGTATCACAGGTGTGGTGAATGTGGGAAAGCCTTCACCCGCAAAGACACACT	25
Query	900	TGCTCGGCATCAGAGAATCCACAC	923
Sbjct	24	 TGCTCGGCATCAGAGAATCCACAC	1

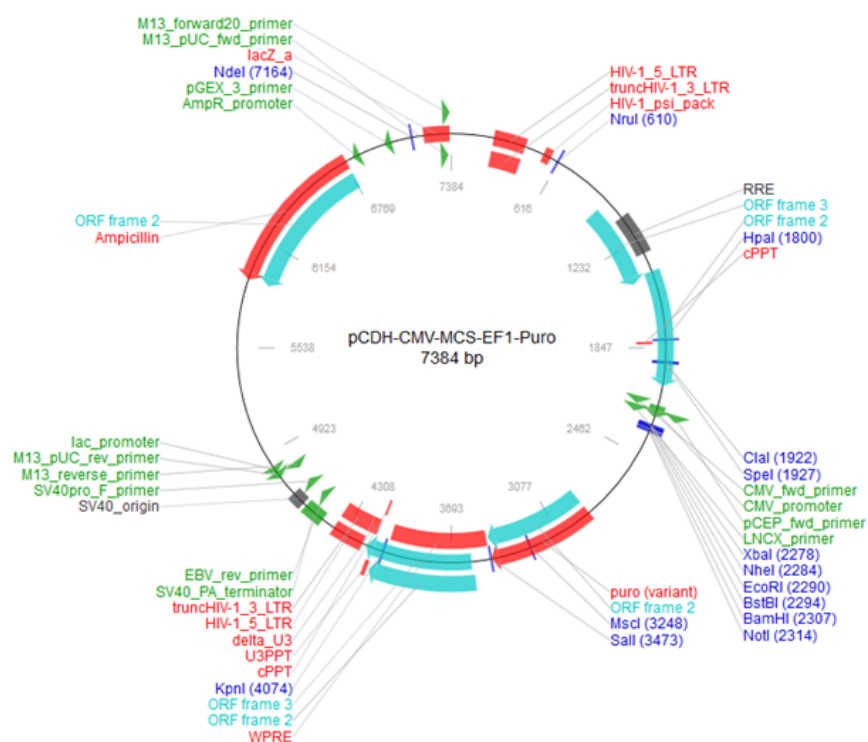
Anhang

7.7 Vektorkarten

7.7.1 pCMV-SPORT6



7.7.2 pCDH



7.8 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellen

Tabelle 1 – Übersicht über die untersuchten Gene mit Funktion des exprimierten Gens	16
Tabelle 2 – für die Produktion der Lentiviren nötige Plasmide.....	30
Tabelle 3 – benötigte Chemikalien und Menge für MSP	38
Tabelle 4 – MS-PCR-Protokoll am RotorGene Q	38
Tabelle 5 – benötigte Chemikalien und Menge für Long-Expand-PCR	42
Tabelle 6 – Protokoll für Long-Expand-PCR am Thermocycler (Eppendorf)	42
Tabelle 7 – benötigte Chemikalien und Menge für Restriktionsverdau	43
Tabelle 8 – benötigte Chemikalien und Menge für Ligation.....	43
Tabelle 9 – benötigte Chemikalien und Menge für qPCR	45
Tabelle 10 – qPCR-Protokoll am Abi7300	46
Tabelle 11 – benötigte Chemikalien und Menge für ein Trenngel (10 ml)	49
Tabelle 12 – benötigte Chemikalien und Menge für ein oder zwei Sammelgele.....	49
Tabelle 13 – Ergebnisse Expressionsuntersuchungen in Bezug auf die methylierten Zelllinien	53
Tabelle 14 – Ergebnisübersicht über alle Methylierungs- und Expressionsuntersuchungen für ZNF671..	69
Tabelle 15 – Mikroskopische Auswertung der RNA-RNA <i>in situ</i> Hybridisierung und gleichzeitig Expressionsresultate aus den qPCR-Versuchen (4.1.4)	72
Tabelle 16 – Übersicht über die sieben Transkriptvarianten von ZNF671.....	74
Tabelle 17 – Anzahl der angefärbten Kolonien	85

Abbildungen

Abbildung 1 – Mortalitätsrate bei Frauen in Deutschland, links: Zervixkarzinom, rechts: alle Krebsentitäten (außer Lunge), GLOBOCAN 2012.....	7
Abbildung 2 – Modell der HPV-vermittelten Zervixkarzinogenese, Viruspartikel dringen über Mikroverletzungen ins Epithel ein und infizieren Basalzellen, virale DNA wird von den Wirtszellen gebildet und an Tochterzellen weitergegeben, welche suprabasal auswandern, über CIN-Vorstufen kann sich ein CxCa entwickeln (modifiziert nach Woodman 2007).....	9
Abbildung 3 – Arbeitsschema	18
Abbildung 4 – schemat. Darstellung der Mikrodissektion mittels Mikromanipulator	28
Abbildung 5 – schematische Darstellung der Vorgehensweise zur lentiviralen Transduktion	32
Abbildung 6 – Bisulfitkonversion von Cytosin [C] über Cytosinsulfonat [C-SO ₃] und Uracilsulfonat [U-SO ₃] zu Uracil [U]	37
Abbildung 7 – Random Hexamer-Primer binden zufällig über die gesamte Länge der RNA	45
Abbildung 8 – schematische Darstellung der RNA-RNA <i>in situ</i> Hybridisierung.....	46
Abbildung 9 – Aufbau des Sandwichs für den Tank-Blot.....	50
Abbildung 10 – Auswertung aller Zelllinien für ASTN1, Box-Plot und Säulendiagramm, Expression ist relativ zu HPRT dargestellt und Methylierung relativ zu ACTB, Signifikanzwert in der Box-Plot-Darstellung	

Anhang

nach Mann-Whitney U Test, Signifikanz ist mit * gekennzeichnet, Zelllinien der „methyliert“-Gruppe sind im Säulendiagramm blau markiert.....	55
Abbildung 11 – Auswertung aller Zelllinien für NXP1, Box-Plot und Säulendiagramm, Expression ist relativ zu HPRT dargestellt und Methylierung relativ zu ACTB, Signifikanzwert in der Box-Plot-Darstellung nach Mann-Whitney U Test, Signifikanz ist mit * gekennzeichnet, Zelllinien der „methyliert“-Gruppe sind im Säulendiagramm blau markiert.....	56
Abbildung 12 – Auswertung aller Zelllinien für SOX17, Box-Plot und Säulendiagramm, Expression ist relativ zu HPRT dargestellt und Methylierung relativ zu ACTB, Signifikanzwert in der Box-Plot-Darstellung nach Mann-Whitney U Test, Signifikanz ist mit * gekennzeichnet, Zelllinien der „methyliert“-Gruppe sind im Säulendiagramm blau markiert.....	57
Abbildung 13 – Auswertung aller Zelllinien für ZNF671, Box-Plot und Säulendiagramm, Expression ist relativ zu HPRT dargestellt und Methylierung relativ zu ACTB, Signifikanzwert in der Box-Plot-Darstellung nach Mann-Whitney U Test, Signifikanz ist mit * gekennzeichnet, Zelllinien der „methyliert“-Gruppe sind im Säulendiagramm blau markiert.....	58
Abbildung 14 – Box-Plot-Darstellungen der Methylierung (links) und Expression (rechts) aller CxCa Zelllinien und HPKs, Methylierung ist relativ zu ACTB und Expression relativ zu HPRT dargestellt	60
Abbildung 15 – Punktdiagramm für die Methylierungs- (links) und Expressionsänderung (rechts) nach einer Behandlung der Zelllinien mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin, Werte sind logarithmisch aufgetragen und zur besseren Darstellung wurden die beiden Messpunkte „Kontrolle“ (Kultivierung der Zellen unter Standardbedingungen) und „5-Aza-CdR“ (Kultivierung der Zellen mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin) durch eine Linie verbunden, Methylierung ist relativ zu ACTB und Expression relativ zu HPRT dargestellt.....	62
Abbildung 16 – Box-Plot-Darstellungen der relativen Methylierung (links) und relativen Expression (rechts) unter einer Behandlung der CxCa Zelllinien CaSki, HeLa, ME 180, MRI H186, SiHa und SW756 unter Standardbedingungen (Kontrolle) und mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-CdR) für ZNF671, Methylierung ist relativ zu ACTB und Expression relativ zu HPRT aufgetragen.....	63
Abbildung 17 – HE-Färbungen verschiedener Gewebe, links (a, c, e) 10 x 5-fache Vergrößerung, rechts (b, d, f) 10 x 10-fache Vergrößerung	64
Abbildung 18 – Box-Plot-Darstellungen der Methylierung (links) und Expression (rechts) der Gesamtgewebeprobe, Methylierung und Expression sind relativ zu ACTB dargestellt.....	66
Abbildung 19 – HE-Färbungen des Schnittes 2674 T (CIN3), links (a, c) 10 x 5-fache Vergrößerung, rechts (b, d) 10 x 10-fache Vergrößerung	67
Abbildung 20 – Box-Plot-Darstellungen der Methylierung (links) und Expression (rechts) der mikrodissezierten Gewebeprobe, Methylierung und Expression sind relativ zu ACTB dargestellt	68
Abbildung 21 – mikroskopische Aufnahmen einiger RNA-RNA in situ Hybridisierungen (10 x 5-fach vergrößert und Ausschnitt 10 x 40-fach vergrößert), links (a, c, e und g) ist antisense- und rechts (b, d, f und h) sense-Sonde dargestellt,	71
Abbildung 22 – Struktur eines C ₂ H ₂ -like Zink-Fingers (modifiziert nach Krishna <i>et al.</i> 2003)	73

Anhang

Abbildung 23 – Übersicht über die verschiedenen Transkriptvarianten von ZNF671, Exonlänge entspricht im Verhältnis der Länge der Rechtecke, Expressionsprimer sind als Pfeil dargestellt	74
Abbildung 24 – Basenpaarsequenz der Transkriptvarianten ZNF671-001 und ZNF671-201, Sequenzunterschiede sind farblich hervorgehoben.....	76
Abbildung 25 – Relative Expression der verschiedenen Transkriptvarianten von ZNF671 in CxCa-Zelllinien, Expression ist relativ zu HPRT aufgetragen.....	77
Abbildung 26 – Relative Expression der verschiedenen Transkriptvarianten von ZNF671 in Geweben, Expression ist relativ zu HPRT aufgetragen.....	78
Abbildung 27 – Restriktionsverdau zur Kontrolle der Umklonierung, nur Klon 3 wurde durch die Restriktionsendonukleasen geschnitten, sodass das Fragment (1622 bp) heraus fällt, L \pm 1kb Plus DNA Ladder	79
Abbildung 28 – HEK293T-Zellen 72 h nach Lipofectamine® 2000-Transfektion mit den Verpackungsplasmiden und GFP-pCDH.....	80
Abbildung 29 – HeLa (a-c) und CaSki-Zellen (d-f), drei Tage nach Transduktion mit den geernteten GFP-pCDH enthaltenen Viren	81
Abbildung 30 – Relative Expression von ZNF671 nach Transduktion der HeLa- und CaSki-Zellen.....	82
Abbildung 31 – Western Blot des Proteinextrakts der transduzierten Zellen (mit dem Leervektor pCDH bzw. mit ZNF671 transduziert) und den Kontrollzellen der jeweiligen Zelllinie, SK-OV-03 wurde als Positivkontrolle mitgeführt	83
Abbildung 32 – Kolonieformierungsassay HeLa, 5 Tage nach Aussaat von 1000 Zellen/well, Färbung mit Kristallviolett.....	84
Abbildung 33 – Ergebnis des Kolonieformierungsassays, aufgetragen ist die relative Anzahl der Kolonien für die mit dem Leervektor und ZNF671 transduzierten Zellen, Koloniezahl ist relativ zur Koloniezahl der Standardzellkultur aufgetragen	85
Abbildung 34 – Ergebnis des MTT-Proliferationsassays, aufgetragen ist die Optische Dichte (OD) bei 570 nm normalisiert auf den MTT-Umsatz nach 3 h, Mittelwerte der neun Versuchsergebnisse sind als Balken dargestellt mit den jeweiligen Standardabweichungen.....	86
Abbildung 35 – oben: a-c) mikroskopische Aufnahme des Migrationsverhaltens der HeLa-Zellen nach 24 h und anschließender Fixierung und Kristallviolettfärbung, a) Kontrollzellen HeLa, b) HeLa-ZNF671, c) HeLa-Leervektor.....	87
Abbildung 36 – oben: a-c) mikroskopische Aufnahme des Invasionsverhaltens der HeLa-Zellen nach 24 h und anschließender Fixierung und Kristallviolettfärbung, a) Kontrollzellen HeLa, b) HeLa-ZNF671, c) HeLa-Leervektor	88
Abbildung 37 – schematische Darstellung der Progression zu einer CIN oder einem CxCa unter Promotor-Hypermethylierung von ZNF671.....	94
Abbildung 38 – schematische Darstellung des molekularen Mechanismus um ZNF671 und ERK3, modifiziert nach Kostenko 2012	97

Anhang

Abbildung 39 – STRING Interaktionsnetzwerk für ZNF671, die Gene ZNF671 und MAPK6 sind hervorgehoben, dargestellt ist, über welche Zwischenschritte diese interagieren können (modifiziert nach http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ZNF671)	98
Abbildung 40 – mittleres Methylierungslevel der 21 CG-Dinukleotide von ZNF671 in CIMP-positiven (rot) und negativen (blau) kleinzelligen Nierenzellkarzinomen, Tian <i>et al.</i> 2014	99
Abbildung 41 – Ergebnisse des Invasionsassays nach ektoptischer Expression von ZNF671, Yeh <i>et al.</i> 2015	100

Danksagung

Ich danke allen, die am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren.

Insbesondere:

Prof. Dr. Matthias Dürst, für die Vergabe des Themas und die damit verbundene Möglichkeit, dieses im Labor für Gynäkologische Molekularbiologie zu bearbeiten,

PD Dr. Roland Schönherr und PD Dr. Andreas Kaufmann für die Übernahme der Gutachten,

Dr. Alfred Hansel, Dr. Martina Schmitz und Dr. Norman Häfner für die stete Diskussionsbereitschaft, die mich in einigen Situationen ein gutes Stück voran gebracht hat,

allen Mitarbeitern des Labors „Gynäkologische Molekularbiologie“ für die tolle Zusammenarbeit über die letzten Jahre

und besonders meinem Mann und unserem Sohn, dafür, dass sie immer an meiner Seite sind.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. Matthias Dürst

Dr. Alfred Hansel

Dr. Martina Schmitz

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe

Jena, den 15. Februar 2016

Juliane Hippe